



Study of the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* interaction

Fabienne Micheli

► To cite this version:

Fabienne Micheli. Study of the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* interaction. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. tel-00489492

HAL Id: tel-00489492

<https://theses.hal.science/tel-00489492>

Submitted on 5 Jun 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PARIS-SUD (XI)
U.F.R SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Document présenté pour obtenir:

L'HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES

Etude de l'interaction *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*

par

Fabienne MICHELI
Chercheur au Cirad - UMR DAP 1098

Soutenance le 21 avril 2009 devant la commission d'examen :

Dr Dominique CROUZILLAT, Nestlé
Pr Michel DRON, Université Paris 11
Dr Pierre MARRACCINI, Cirad
Dr Gilles PILATE, INRA
Dr Jean-Pierre RENOU, INRA

Examineur
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais remercier, en tout premier lieu, le Cirad, pour m'avoir offert l'opportunité d'étudier cette plante si complexe et étrange qu'est le cacaoyer et pour m'avoir permis de travailler en expatriation, expérience unique et enrichissante. Je remercie en particulier Denis Despréaux, Dominique Nicolas et Philippe Petithuguenin pour m'avoir accordé leur confiance lors de mon recrutement et pour avoir continué à croire en mes travaux au cours des années qui ont suivies.

Cette HDR n'existerait pas sans mes collègues brésiliens de l'Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) et de la Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) qui m'ont acceptée malgré les difficultés institutionnelles initiales et malgré leurs doutes sur ce que « cette jeune française » allait pouvoir leur apporter. Ensemble nous avons appris à développer une collaboration aujourd'hui basée sur une relation de confiance et de respect mutuels, le type de relation institutionnelle et personnelle que je souhaite à tout scientifique. En particulier je remercie Júlio César de Mattos Cascardo (UESC) et Karina Peres Gramacho (CEPLAC) pour tout ce que nous avons développé ensemble institutionnellement et surtout scientifiquement. Je remercie également tous les autres collègues de ces deux institutions qui de près ou de loin ont apporté leur contribution aux travaux présentés ici.

Je remercie Didier Clément, Dominique Garcia et Laurence Alemanno pour leurs précieux conseils, leur présence constante et leur amitié. Je dois à Didier de comprendre un peu mieux la génétique moléculaire et l'amélioration du cacaoyer. Son arrivée à la CEPLAC en 2004 a été essentielle pour le développement coordonné de nos actions de recherches. Dominique est l'exemple que les collaborations ne se limitent pas « aux filières » ; son arrivée à l'UESC, en 2004 également, pour travailler en génomique de l'interaction *hevea-Microcyclus ulei* a redonné un « souffle d'air frais » à nos travaux. Je lui dois de longues discussions scientifiques et je le remercie pour sa patience, sa compréhension et pour les nombreux conseils prodigués dans les moments difficiles. Je remercie Laurence pour les travaux que nous avons développés ensemble quand elle travaillait encore au Cirad, et pour la « leçon de vie », ensuite, lors de sa reconversion. Je la remercie pour me montrer chaque jour le chemin de la sagesse ; je la considère comme un exemple de courage et de persévérance et comme la preuve que, dans la vie, tout est possible.

Je remercie de tout cœur les étudiants qui ont travaillé ou travaillent encore à mes côtés ; ils m'ont certainement autant apporté humainement que j'espère leur avoir apporté scientifiquement. Je les remercie pour m'avoir choisie comme encadrant et pour m'avoir aidé à développer ces travaux. La relation encadrant-étudiant est un équilibre subtil et parfois difficile à trouver ; je suis heureuse aujourd'hui du devenir des étudiants qui ont déjà quittés les labos où nous avons travaillé ensemble, et de ne compter parmi eux que des amis.

Je remercie les différents chercheurs des labos où j'ai travaillé, et qui m'ont tous beaucoup appris : les membres du Laboratoire de Biologie Moléculaire et Supramoléculaire de l'IJM où j'ai fait ma thèse, du Department of Forest Genetics and Plant Physiology de la Swedish University of Agricultural Sciences avec qui j'ai collaboré pendant de nombreuses années, du Laboratoire des Interactions Plantes Microorganismes de l'INRA de Toulouse, et des équipes Cacao/CP et Génomique et Sélection/UMR DAP du Cirad.

Je remercie ma famille pour accepter, parfois difficilement, la distance qui nous sépare.

Enfim, eu agradeço de coração o meu marido Abelmon, por tudo, sem nenhuma exceção.

SOMMAIRE

1. Etat civil	5
2. Titres Universitaires	6
3. Parcours	7
3.1. Post-Doctorat	7
3.2. Stages et experiences professionnelles	7
3.3. Compétences techniques	7
3.4. Formations complémentaires	8
3.5. Langues	8
4. Activités d'enseignement	9
4.1. Enseignements théoriques (cours magistraux dispensés à l'UESC)	9
4.2. Développement de matériel didactique	9
4.3. Enseignements pratiques (Ateliers pratiques de 3ème cycle : DEA de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes-Université Paris 6)	9
5. Activités liées à l'administration	10
6. Activités liées à la recherche	11
6.1. Participation a des comites, commissions et jurys d'évaluation	11
6.2. Referee d'articles soumis pour publication (dans des revues internationales à comité de lecture)	12
6.3. Mise en place et participation à des collaborations	13
6.4. Obtention et gestion de projets et de bourses de recherche	14
6.5. Participation actuelle à des projets de recherche (autres que ceux obtenus et gérés en tant que coordinatrice)	16
6.6. Organisation du laboratoire	17
7. Encadrements	18
7.1. Encadrement de stages (2 nd cycle)	18
7.2. Encadrement d'étudiants de 3 ^{ème} cycle (Master et Doctorat de Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC)	19
7.3. Formation de chercheurs et de techniciens	21
8. Publications	22
8.1. Chapitres de livres	22
8.2. Articles	22

8.3. Travaux ayant fait l'objet d'une parution dans les banques de données de séquences nucléotidiques (EMBL-Genbank-DDBJ Batabank Library)	24
8.4. Participations à des colloques et congrès	25
8.5. Séminaires	30
8.6. Autres types de documents	31
9. Synthèse des travaux de recherche	32
9.1. Introduction	32
9.2. Etude de l'interaction <i>Theobroma cacao</i> - <i>Moniliophthora perniciosa</i>	34
9.2.1. Le cacaoyer	34
9.2.2. La cacaoculture brésilienne	35
9.2.3. La maladie du balai de sorcière	38
9.2.4. Culture de <i>M. perniciosa</i> en milieux artificiels	45
9.2.5. Etudes moléculaires et fonctionnelles de <i>M. perniciosa</i>	48
9.2.6. Etudes moléculaires et fonctionnelles de l'interaction cacaoyer- <i>M. perniciosa</i>	50
9.2.6.1. Obtention de banques de cDNA et séquençage d'ESTs	51
9.2.6.2. Etudes fonctionnelles	54
9.2.7. Données génétiques de l'interaction cacaoyer- <i>M. perniciosa</i>	60
9.2.8. Données biochimiques et protéomiques de l'interaction cacaoyer- <i>M. perniciosa</i> .	63
9.3. Considérations sur le contexte de développement des activités de 2002 à aujourd'hui, et conclusions	64
9.4. Projet de recherche : Continuation de l'étude de l'interaction cacaoyer- <i>Moniliophthora perniciosa</i>	67
9.5. Références	70
10. Tableau récapitulatif des publications	77

1. ETAT CIVIL

NOM : MICHELI

PRENOM : Fabienne

DATE ET LIEU DE NAISSANCE : 2 janvier 1974, 35 ans
Montreuil sous Bois, Seine Saint Denis, France

SITUATION FAMILIALE : Mariée

ADRESSE PERSONNELLE : Avenida Bahia 347, Apto 71, Ed. Terrazzas de Ilhéus
Cidade Nova, Ilhéus-BA, Brésil 45652-050
Tél: +55 73 3633 4295 (domicile); +55 73 9111 5942 (portable)

ADRESSE PROFESSIONNELLE: Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)
Departamento de Ciencias Biológicas (DCB)
Centro de Biotecnologia e Genética (CBG)
Sala dos Professores nº1
Rodovia Ilhéus-Itabuna km16
Ilhéus, Bahia, Brasil 45662-000
Tél: +55 73 3680 5196
Fax : +55 73 3680 5226
E-mail: fabienne.micheli@cirad.fr

ADRESSE ADMINISTRATIVE: Cirad UMR DAP
Equipe Genomique et Sélection
Avenue Agropolis - TA 80 / 03
34398 Montpellier cedex 5 - France
E-mail: fabienne.micheli@cirad.fr

PAGES WEB:

Cirad: <http://www.cirad.fr/>

UESC: <http://www.uesc.br/>

F. Micheli: <http://agents.cirad.fr/index.php/fabienne.micheli@cirad.fr>

Lattes CNPq F. Micheli: <http://lattes.cnpq.br/2940601420337733>

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UESC (Ecole Doctorale):
http://www.uesc.br/genetica/index.php?item=conteudo_apresentacao.php

SITUATION PROFESSIONNELLE ACTUELLE : Chercheuse Cirad

Recrutée le 24 juin 2002 (CDI) au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad, Montpellier, France) en tant que biologiste moléculaire.

Rattachée au Département BIOS (Système Biologique), UMR DAP (Développement et Amélioration des Plantes)

Affectée le 01 octobre 2002 à l'Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Ilhéus, Bahia, Brésil (expatriation)

2. TITRES UNIVERSITAIRES

- 2001 **Inscrite sur les listes de qualification aux fonctions de Maître de Conférence (Section 66 - Physiologie).** N° qualification : 01266113117
- 1997-2001 **Doctorat de Biologie de l'Université Paris 6**
Mention Très Honorable avec Félicitations du Jury
Titre: Etude moléculaire et biochimique des pectine méthylestérases dans la différenciation cambiale chez le peuplier (sous la direction du Pr. Renée Goldberg, Institut Jacques Monod, Paris).
Date de soutenance : 11 décembre 2000.
Financement: Contrat de la Communauté Economique Européenne FAIR CT-98-3972 Wood formation processes: the key to improvement of the raw material (CCD de 3 ans géré par le CNRS-date de fin de contrat : mars 2001).
- 1996-1997 **DEA de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes** (Université Paris 6). **Mention Assez Bien.**
Titre: Caractérisation de la famille multigénique codant les pectine méthylestérases chez *Arabidopsis thaliana* en vue de l'isolement de mutants par *T-DNA tagging PCR*
- 1995-1996 **Maîtrise de Biologie des Organismes et des Populations** (Université Paris 6).
Option Biologie Végétale. **Mention Assez Bien.**
- 1994-1995 **Licence de Biologie des Organismes** (Université Paris 6). **Mention Bien.**
- 1992-1994 **DEUG B 1ère année** (Université Paris 6). **Mention Bien.**
DEUG B 2ème année (Université Paris 6). **Mention Bien.**

3. PARCOURS

3.1. POST-DOCTORAT

2001-2002 **Contrat post-doctoral** au Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes (INRA, Toulouse, France) sous la direction du Dr. Pascal Gamas.

Thème des recherches : Etude du programme symbiotique précoce de *Medicago truncatula* par génomique fonctionnelle.

Financement : Contrat de la Communauté Economique Européenne QRLG2-CT-2000-30696 (CCD, initialement de 2 ans, géré par l'INRA).

3.2. STAGES ET EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Mai-Juin 1998 Vacataire CNRS au titre d'Assistante de Recherche au Laboratoire d'Enzymologie en Milieu Structuré (Directeur: Pr. Goldberg. Institut Jacques Monod, Paris).

Juill.-Sept. 1995 Stage réalisé au Laboratoire de Physiologie du Développement des Plantes (Directeur: Pr. Miginiac. Université Paris 6) concernant la caractérisation hormonale d'un mutant de développement racinaire d'*Arabidopsis thaliana*.
Ce stage a fait l'objet d'un rapport soutenu devant un jury. Mention Excellent.

Juill. 1994 Stage réalisé au Laboratoire de Cytologie Expérimentale et Morphogenèse Végétale (Directeur: Pr. Chriqui. Université Paris 6) sur la culture *in vitro* du tabac et de l'eucalyptus.

3.3. COMPETENCES TECHNIQUES

Biologie moléculaire:

- obtention et criblage de banques génomique, d'ADNc et SSH (hybridation soustractive et suppressive);
- clonage, séquençage;
- extraction d'ADN génomique, plasmidique et phagique;
- extraction d'ARN, purification d'ARNm, synthèse et marquage de sondes d'ADNc par rétrotranscription;
- PCR, RT-PCR;
- Southern blot, Northern blot, Reverse Northern, Macroarrays;
- transformation bactérienne, transformation de plantes par *Agrobacterium tumefaciens*;
- criblage de banques de mutants d'insertion d'*Arabidopsis* par *T-DNA tagging PCR* ;
- surexpression de protéines en système hétérologue (*Escherichia coli*).

Biochimie:

- détection d'activités enzymatiques (pectinases, protéases, chitinases) ;
- extraction de protéines pariétales sur macro- et microéchantillons;
- isoélectrofocalisation, SDS-PAGE ;
- Western blot;
- Chromatographie d'exclusion, chromatographie d'affinité, chromatographie Liquide à Haute Pression (HPLC);
- dosage ELISA.

Culture *in vitro*:

- préparation de milieux de culture;
- repiquage d'organes végétaux;
- criblage de transformants sur milieu sélectif;
- régénération de plantes.

Microtomie et cytologie:

- microtomie à congélation;
- notions de fixation (pour histologie classique, hybridation *in situ* et immunolocalisation) et d'inclusion de matériel végétal (paraffine, LR-white).

Bioinformatique:

- détection et identification de SNPs
- annotation fonctionnelle de genes (bibliothèques d'ESTs et SSH)
- utilisation de banques de séquences (Genbank, Embl);
- recherche de motifs au sein de séquences nucléotidiques et protéiques (e.g. Prodom);
- alignements de séquences, phylogénie (e.g. ClustalW).

3.4. FORMATIONS COMPLEMENTAIRES

2002	Formation en Portugais (30h)	ACB Format, Montpellier
2002	Formation en Anglais (20h)	ACB Format, Montpellier

3.5. LANGUES

Français : langue maternelle

	Portugais	Anglais	Espagnol
Compréhension	Courant	Bon niveau	Niveau moyen
Parlé	Courant	Niveau moyen	-
Lu	Courant	Bon niveau	Bon niveau
Ecrit	Courant	Bon niveau	-

4. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

4.1. ENSEIGNEMENTS THEORIQUES (cours magistraux dispensés à l'UESC)

- 2008 Discipline enseignée: Méthodes en recherche scientifique
Niveau: 3^{ème} cycle.
Durée : 60 heures.
Langue utilisée: portugais.
- 2008 Discipline enseignée: Rédaction d'articles scientifiques liés à l'expression de gènes.
Niveau: 3^{ème} cycle.
Durée : 45 heures.
Langue utilisée: portugais.
- 2007 Discipline enseignée: Rédaction d'articles scientifiques liés à l'obtention de marqueurs moléculaires (SSR et SNP) à partir de bibliothèques de cDNA.
Niveau: 3^{ème} cycle.
Durée : 45 heures.
Langue utilisée: portugais.
- 2007 Discipline enseignée: Sécurité de Laboratoire.
Niveau: 2nd, 3^{ème} cycles et professionnels.
Durée : 25 heures.
Langue utilisée: portugais.
- 2005 Discipline enseignée: Sécurité de Laboratoire.
Niveau: 2nd et 3^{ème} cycles.
Durée : 25 heures.
Langue utilisée: portugais.
- 2003 Discipline enseignée: Biotechnologies : transgénèse végétale et culture *in vitro*.
Niveau: maîtrise.
Durée : 16 heures réparties sur 2 mois.
Langue utilisée: portugais.

4.2. DEVELOPPEMENT DE MATERIEL DIDACTIQUE

- 2005 Alvim F, Pungartnik C, Gesteira A, Pires A, Mariano A, **Micheli F**, Neuby J, Loguercio L, Costa M, Brendel M. Apostila do Curso de Segurança Laboratorial e Biossegurança.

4.3. ENSEIGNEMENTS PRATIQUES (Ateliers pratiques de 3^{ème} cycle : DEA de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes-Université Paris 6)

- 1999 **Christophe Garcion**
Thème: Etudes électrophorétique et immunologique des pectine méthylestérases de la zone cambiale du peuplier.
- 1998 **Claire Hutin et Anne Damais**
Thème: Etude moléculaire et enzymatique du rôle des pectine méthylestérases dans la différenciation cambiale chez le peuplier.

5. ACTIVITES LIEES A L'ADMINISTRATION

2009-2011 **Membre de la Chambre d'Evaluation de la FAPESB (*Câmara de Assessoramento e Avaliação da FAPESB/ Ciências Biológicas*)**

2008-2010 **Vice-coordinatrice de l'Ecole Doctorale "Génétique et Biologie Moléculaire" de l'UESC (*Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular*)**

L'Ecole Doctorale "Génétique et Biologie Moléculaire" de l'UESC forme depuis 2002 des étudiants de Master et depuis 2006 des Docteurs dans le domaine de la génétique classique et de la biologie moléculaire végétale et animale. Cette formation (2 et 4 ans, pour le Master et le Doctorat, respectivement) comprend des cours théoriques (modules) et le développement d'un projet de recherche (en laboratoire et/ou sur le terrain) sous la responsabilité d'une commission d'orientation (encadrant principal, co-encadrant et conseiller). Le diplôme de Master et de Doctorat est obtenu après analyse d'un mémoire (dissertation ou thèse) et après soutenance des travaux de recherche devant un jury composé de membres externes et internes à l'UESC. D'autres critères, comme la soumission d'un article scientifique de rang A, sont nécessaires pour l'obtention du diplôme. La fonction de coordination et vice-coordination de l'Ecole Doctoral consiste en : i) obtention et gestion de bourses d'étude auprès de bailleurs de fonds spécifiques (e.g. CAPES, CNPq) ; ii) gestion des fonds attribués par l'UESC à l'Ecole Doctorale ; iii) organisation des cours théoriques dispensés aux étudiants ; iv) organisation et participation au processus de sélection des étudiants ; v) organisation des soutenances ; vi) adéquation et maintien de l'Ecole Doctorale aux critères de qualité requis par la CAPES, organisme national de gestion des Ecole Doctorales.

2005-2008 **Membre de la Commission de Biosécurité (CiBio) de l'Universidade Estadual de Santa Cruz.**

La CiBio a pour rôle, entre autres: i) de diffuser l'information relative aux normes de sécurité de laboratoire sous forme de séminaires bisannuels obligatoires à toute personne (étudiant ou professionnel) travaillant dans un laboratoire possédant la norme CQBio (laboratoires de risque 1 et 2 dans le cas de l'UESC) ; ii) d'aider à mettre en place les conditions physiques (installations des locaux, traitement des déchets...) correspondant aux normes de sécurité ; iii) de contrôler l'adéquation des projets de recherche aux locaux et équipements où ils seront effectués ; iv) de recenser les organismes génétiquement modifiés utilisés dans les laboratoires.

6. ACTIVITES LIEES A LA RECHERCHE

6.1. PARTICIPATION A DES COMITES, COMMISSIONS ET JURYS D'EVALUATION

- 2009 **Membre du Jury de qualification au doctorat de Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC de Bruna Carmo Rehem** (Photosynthesis, chemical composition and oxidative stress in *Theobroma cacao* hybrids with the letal gene *Luteus*-Pa Mutant). Membres du Jury : Dr. Marco Antonio Aguilar (CEPLAC), Dr. Marcio Costa (UESC), Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida (UESC).
- 2009 **Membre du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Amanda Ferreira da Silva** (Otimização das condições de regeneração in vitro em *Citrus sinensis* (L.) Osb. e incorporação dos genes da biossíntese de carotenoides *pds* e *beta-lcy* por meio de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*). Membres du Jury : Dr. Marcio Costa (UESC), Dr. Rachel Camargo (IAC), Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida (UESC).
- 2008 **Vice-Coordinatrice du Workshop d'Evaluation et Planification du Developpement de l'Ecole Doctorale « Génétique et Biologie Moléculaire » de l'UESC**
Le workshop a eu pour rôle : i) de divulguer l'état des lieux du developpement de l'Ecole Doctorale (thématiques scientifiques, production scientifique, nombres d'étudiants, etc.) ; ii) de prendre connaissance des nouvelles regles de fonctionnement et d'évaluation des Ecoles Doctorales par la CAPES ; et iii) de developper des stratégies à court et moyen terme pour adhérer aux conditions de la CAPES. Le workshop, developpé sur 2 jours, a consisté en presentations du Coordinateur (R.X. Corrêa) et de la Vice-Coordinatrice (F. Micheli) de l'Ecole Doctorale et du Coordinateur de la CAPES (E. Moura) et en groupes de travail a partir de différents thèmes liés au developpement de l'Ecole Doctorale (Enseignement, Internationalisation, Production scientifique, Obtention de ressources propres et utilisation des équipements, Encadrement des étudiants). Les groupes de travail étaient constitués d'encadrants et d'étudiants de l'Ecole Doctorale, et de représentants institutionnels.
- 2008 **Membre du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Wagner Gonçalves Macêna** (Clonagem do gene *MpATG8* de *Moniliophthora perniciosa* em *Saccharomyces cerevisiae* e análise da variação de expressão gênica ao longo do ciclo de vida de *M. perniciosa*). Membres du Jury : Dr. Cristina Pungartnik (UESC), Dr. Abelmon Gesteira (UESC), Dr. Ana Paula Uetanabaro (UEFS).
- 2008 **Présidente du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Braz Tavares da Hora Júnior** (Estudo da expressão gênica diferencial do cacaueiro em resposta à infecção por *Moniliophthora perniciosa*). Membres du Jury : Dra Sônia Zingaretti (UNESP), Dr. Sergio Brommonschenkel (UFV), Dr. Marcio Costa (UESC).
- 2008 **Membre du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Thiago Edson Ribeiro da Silva** (Morfogênese in vitro e transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* de clones de cacaueiros (*Theobroma cacao* L.)). Membres du Jury : Dr. Sergio Brommonschenkel (UFV), Dr. Alex-Alan Furtado de Almeida, Dr. Marcio Costa (UESC).
- 2007 **Membre du Jury de promotion anticipée au doctorat de Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC de Tatiana Basso** (Sensitivity to Sn^{2+} of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* depends on general energy metabolism, metal transport, anti-oxidative defences, and DNA repair). Membres du Jury : Dr. Martin Brendel (UESC), Dr. George Sodré (CEPLAC), Dr. Marcio G.C. Costa (UESC).
- 2007 **Membre de la Commission de Sélection des Etudiants de 3^{ème} cycle en Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC** (Promotion 2008).
Elaboration du processus de sélection des étudiants de Master et de Doctorat de Génétique de l'UESC : i) divulgation de l'ouverture du cours de Master et de Doctorat ; ii) réception et analyse des inscriptions ; iii) élaboration, organisation et évaluation des épreuves écrites et orales, et des pré-projets de Doctorat ; iv) élaboration de la liste des étudiants acceptés au Master et au Doctorat pour homologation auprès du directeur de l'UESC.
- 2007 **Présidente du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Heliana Argôlo Santos Carvalho** (Estudo funcional de cisteína proteases da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*). Membres du Jury : Dr Luis Cesar Paulillo (UEFS), Dra Karina Gramacho (CEPLAC), Dr. Júlio Cascardo (UESC).

- 2007 **Présidente du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Livia Santos Lima** (Identificação de polimorfismo em ESTs de cacau associados a interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*). Membres du Jury : Dr. Didier Clément (Cirad), Dr Ronan Corrêa (UESC), Dr. Júlio Cascardo (UESC).
- 2006 **Membre de la Commission de Sélection des Etudiants de 3^{ème} cycle en Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC** (Promotion 2007).
Elaboration du processus de sélection des étudiants de Master et de Doctorat de Génétique de l'UESC : i) divulgation de l'ouverture du cours de Master et de Doctorat ; ii) réception et analyse des inscriptions ; iii) élaboration, organisation et évaluation des épreuves écrites et orales, et des pré-projets de Doctorat ; iv) élaboration de la liste des étudiants acceptés au Master et au Doctorat pour homologation auprès du directeur de l'UESC.
- 2005 **Présidente du Jury d'évaluation de la soutenance de Master de Maíza Alves Lopes** (Estudo molecular de quitinasas de *Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer). Membres du Jury : Dr. Aristóteles Goes Neto (UEFS), Dr. Marcio Costa (UESC).
- 2005 **Membre de la Commission de Sélection des Etudiants de 3^{ème} cycle en Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC** (Promotion 2006/2008).
Elaboration du processus de sélection des étudiants de Master de Génétique de l'UESC : i) divulgation de l'ouverture du cours de Master ; ii) réception et analyse des inscriptions ; iii) élaboration, organisation et évaluation des épreuves écrites et orales ; iv) élaboration de la liste des étudiants acceptés au Master pour homologation auprès du directeur de l'UESC.
- 2005 **Membre de la Commission de Sélection des Etudiants « Candidats Libres » de 3^{ème} cycle en Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC** (Promotion 2005/2007).
Sélection des étudiants (analyse des dossiers) souhaitant effectuer en candidats libres certains des modules du Master de Génétique de l'UESC.
- 2003 **Participation au Comité de Sélection Technico-Scientifique du 2^o Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**, Porto Seguro, Bahia, Brésil.
Sélection des travaux (résumés de posters et de présentations orales) soumis pour participation au congrès.
- 2001 **Membre du Comité d'Organisation des Journées de l'IFR 40** (regroupant l'INRA, l'UMR 5546 de l'Université Paul Sabatier et l'ENSAT, Toulouse).
Membre du Comité d'Organisation des Journées de l'IFR40 qui a eu pour rôle de mettre en place, sur deux jours, des sessions de séminaires et de posters représentatives des travaux de recherche effectués au sein de l'IFR40 au cours des années 1999-2001.
- 1999 **Membre du Jury d'évaluation du Mémoire de Maîtrise de Christophe Garcion** (Etudes électrophorétique et immunologique des pectine méthylestérases de la zone cambiale du peuplier). Membres du Jury : Dr. L Richard (UPMC-Paris 6), Dr. A-M Catesson (UPMC-Paris 6).

6.2. REFEREE D'ARTICLES SOUMIS POUR PUBLICATION (dans des revues internationales à comité de lecture)

- 2009 Referee d'article soumis pour publication dans *Journal of Experimental Botany*
- 2008 Referee d'article soumis pour publication dans *Molecular Breeding*
- 2007 Referee d'article soumis pour publication dans *Proteins*
- 2006 Referee d'article soumis pour publication dans *Planta*
- 2005 Referee d'article soumis pour publication dans *Plant Physiology*
- 2005 Referee d'article soumis pour publication dans *Journal of Experimental Botany*
- 2004 Referee d'article soumis pour publication dans *BioTechniques*
- Sept. 2004 Referee d'article soumis pour publication dans *Journal of Experimental Botany*
- Mai 2004 Referee d'article soumis pour publication dans *Journal of Experimental Botany*
- 2003 Referee d'article soumis pour publication dans *Biotechnology Progress*.

2003	Referee d'article soumis pour publication dans <i>Planta</i>
2002	Referee d'article soumis pour publication dans <i>Planta</i>
2001	Referee d'article soumis pour publication dans <i>Trends in Plant Science</i>

6.3. MISE EN PLACE ET PARTICIPATION A DES COLLABORATIONS

Inter-institutionnelles :

Dept. of Forest Genetics and Plant Physiology, SLU, Umeå, Sweden

Dr. Björn Sundberg et Dr. Ewa Mellerowicz

Dans le cadre d'un contrat de la Communauté Economique Européenne FAIR CT-98-3972.

Valorisation de la collaboration sous forme d'échanges de matériel végétal et de publications (articles, posters).

University of Reading, Plant Sciences Laboratories, Reading, UK

Dr. Peter Goodenough

Dans le cadre d'un contrat de la Communauté Economique Européenne FAIR CT-98-3972.

Valorisation de la collaboration sous forme d'expériences et de publications (articles, posters).

Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld, Germany

Dr. Helge Küster

Dans le cadre d'un contrat de la Communauté Economique Européenne QRLG2-CT-2000-30696.

Valorisation de la collaboration sous forme d'expériences, d'échanges de matériel et de publications (posters).

Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus-BA, Brasil

Dr. Júlio Cascardo

Dans le cadre d'un accord Cirad cacao-UESC.

Valorisation de la collaboration sous forme d'accueils scientifiques, d'expériences, d'encadrement d'étudiants et de publications (articles, posters).

CEPLAC/CEPEC, Ilhéus-BA, Brasil

Dr. Uilson Lopes et Dr. Karina Gramacho

Dans le cadre d'un accord Cirad-UESC.

Valorisation de la collaboration sous forme d'expériences, d'encadrement d'étudiants, d'échanges de matériel végétal et de publications (articles, posters).

La collaboration développée a également favorisé le montage d'une coopération Cirad-CEPLAC qui s'est concrétisée fin 2004 par l'affectation du Dr. Didier Clément (Cirad) au CEPEC.

Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA, Brasil

Dr. Aristóteles Góes Neto

Dans le cadre d'une participation à un projet de recherche coordonné par le Dr. Neto.

Valorisation de la collaboration sous forme d'expériences, d'encadrement d'étudiants (Master) et de publications (articles, posters).

UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil

Dr. Sônia Zingaretti di Mauro

Dans le cadre d'un projet FAPESB coordonné par F. Micheli

Valorisation de la collaboration sous forme d'expériences et de publications (articles, posters).

Intra-institutionnelles :

Cirad CP/programme hévéa

Dr. Dominique Garcia

Le développement et le bon fonctionnement de la collaboration Cirad cacao-UESC ont grandement facilité le montage d'une coopération Cirad hévéa-UESC portant sur l'étude de l'interaction hévéa-*Microcyclus ulei* par génomique fonctionnelle. Cette nouvelle collaboration s'est concrétisée fin 2004 par l'affectation du Dr. Dominique Garcia (Cirad) à l'UESC et a favorisé le développement d'une thématique plus large portant sur l'étude des interactions plantes perennes-pathogènes.

6.4. OBTENTION ET GESTION DE PROJETS ET DE BOURSES DE RECHERCHES¹

Projets de recherche

- 2008-2010 **Projet FAPESB, Coordinateur : F. Micheli**
Thème des recherches : Estudo molecular da interação cacau-*Ceratocystis cacaofunesta*.
Durée du financement : 2 ans
Montant : R\$ 44 820
- 2008-2010 **Projet CNPq, Coordinateur : F. Micheli**
Thème des recherches : Prospecção de plantas para estabelecimento de um patossistema modelo da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*
Durée du financement : 2 ans
Montant : R\$ 33 000
- 2008-2010 **Projet BNB, Coordinateur : F. Micheli**
Thème des recherches : Caracterização de pectinases do *Crinipellis perniciosa* para aplicações biotecnológicas
Durée du financement : 2 ans
Montant : R\$ 30 000
- 2007-2010 **Projet CNPq, Coordinateur : F. Micheli**
Thème des recherches : Estudo funcional de fatores de transcrição WRKY da interação cacau-*Crinipellis perniciosa*.
Durée du financement : 2 ans, prolongé pour 1 an
Montant : R\$ 32 000
- 2004-2007 **Projet FAPESB, Coordinateur : F. Micheli**
Thème des recherches : Determinação de genes envolvidos na resistência do cacau ao *Crinipellis perniciosa* via microarrays.
Durée du financement : 2 ans, prolongé pour 6 mois
Montant : R\$ 15 000
- 2006-2007 **Financement FAPESB attribuée à Livia Santos Lima, étudiante de Master.**
Thème des recherches : Identificação de polimorfismo em ESTs de cacau associados a interação cacau-*Crinipellis perniciosa*.
Durée du financement : 1 an
Montant : R\$ 5 000
- 2006-2007 **Financement FAPESB attribuée à Braz Tavares da Hora Junior, étudiant de Master.**
Thème des recherches : Determinação de genes envolvidos na resistência do cacau ao *Crinipellis perniciosa* via arrays.
Durée du financement : 1 an
Montant : R\$ 5 000
- 2006-2007 **Financement FAPESB attribuée à Maíza Alves Lopes, étudiante de Doctorat.**
Thème des recherches : Estudo funcional de fatores de transcrição WRKY da interação cacau-*Crinipellis perniciosa*
Durée du financement : 1 an
Montant : R\$ 7 000

Total des financements en tant que coordinateur : R\$ 171 820 = 66 100 euros

¹ R\$ 1 ≈ 0,376 €

Bourses de recherche

- 2009-2011 **Bourse CNPq relative à la Production Scientifique attribuée à Fabienne Micheli (*Bolsista de Produtividade do CNPq*)**
Projet présenté: Genômica da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*: uma base comum aos estudos de sinalização da resistência e ao melhoramento do cacauero
Durée de la bourse: 3 ans
Valeur mensuelle de la bourse: R\$ 980
- 2008-2009 **Bourse CNPq (PIBIC) attribuée à Thyago Hermylly Santana Cardoso, étudiant de Maîtrise.**
Thème des recherches : Caracterização bioquímica de uma cisteína protease de cacau.
Durée de la bourse : 1 an
- 2007 **Bourse PROIIC (UESC) attribuée à Sanderson Tarciso Pereira de Sousa, étudiant de DEUG.**
Thème des recherches : Obtenção e clonagem em sistema heterólogo de genes de quitinases de *Moniliophthora perniciosa*.
Durée de la bourse : 6 mois
- 2007-2008 **Bourse CNPq (PIBIC) attribuée à Elisângela Alves dos Santos, étudiante de Licence puis à Nara Georgia Ribeiro Braz, étudiante de maîtrise.**
Thème des recherches : Otimização e validação de microssatélites (SSRs) oriundos de ESTs da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*.
Durée de la bourse : 1 an
- 2007-2010 **Bourse FAPESB/CAPES attribuée à Lívia Santos Lima, étudiante de Doctorat.**
Thème des recherches : Caracterização de genes da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa* diferencialmente expressos em genótipos de cacauero com diferentes fontes de resistência à vassoura-de-bruxa.
Durée de la bourse : 3 ans
- 2007-2008 **Bourse FAPESB (AT) attribuée à Heliana Argôlo Santos Carvalho.**
Durée de la bourse : 1 an
- 2007-2008 **Bourse FAPESB (IC/UESC) attribuée à Glaucea Cabral dos Santos, étudiante de Maîtrise.**
Thème des recherches : Busca de promotores de fatores de transcrição WRKY da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*.
Durée de la bourse : 1 an
- 2006-2009 **Bourse FAPESB attribuée à Maíza Alves Lopes, étudiante de Doctorat.**
Thème des recherches : Estudo funcional de fatores de transcrição WRKY da interação cacau-*Crinipellis perniciosa*.
Durée de la bourse : 3 ans
- 2005-2006 **Bourse PROIIC (UESC) attribuée à Dayane Santos Gomes, étudiante de Maîtrise.**
Thème des recherches : Análise molecular e bioquímica da regulation metabolica de quitinases do *Crinipellis perniciosa*.
Durée de la bourse : 8 mois
- 2003-2005 **Bourse FAPESB attribuée à Maíza Alves Lopes, étudiante de Master.**
Thème des recherches : Caracterização bioquímica e funcional de quitinase em *Crinipellis perniciosa*, fungo causador da vassoura-de-bruxa no cacauero.
Durée de la bourse : 2 ans prolongé pour 3 mois (fin du Master)
- 2004-2005 **Bourse PROIIC (UESC) attribuée à Dayane Santos Gomes, étudiante de Licence.**
Thème des recherches : Análise da expressão de um gene de quitinase do *Crinipellis perniciosa*.
Durée de la bourse : 1 an

2004-2005 **Bourse PROIIC (UESC) attribuée à Gílvia Simone Andrade de Oliveira, étudiante de DEUG.**
Thème des recherches : Análise do efeito da quitinase do *Crinipellis pernicioso* no crescimento de fungos fitopatogénos.
Durée de la bourse : 1 an

6.5. PARTICIPATION ACTUELLE A DES PROJETS DE RECHERCHE (autres que ceux obtenus et gérés en tant que coordinatrice)

« **Projet Genuaçu** »

Financement : Embrapa (Macroprograma 2)
Valeur : R\$ 408 584
Date de début du projet : 2009
Coordinateur : Rafaél Moyses Alves (CPATU-PA)

« **Functional analysis of candidate genes for resistance of cacao to witches' broom disease: *in planta* evidences.** »

Financement: IFS.
Valeur: 12 000 USD.
Date de début de projet: mars 2008
Coordinateur : Abelmon Gesteira (UESC)

« **Piramidização de genes de resistência à vassoura-de-bruxa visando a seleção de novas variedades resistentes ao fungo *Crinipellis pernicioso*** »

Financement : CNPq
Valeur : R\$ 45 000
Date de début du projet : mars 2007
Coordinateur : Karina Gramacho (CEPLAC)

« **Análise funcional da proteína relacionada a patogenicidade (PR10) isolada de uma biblioteca de cDNA da interação *Theobroma cacao*-*Crinipellis pernicioso*** »

Financement : CNPq
Valeur : R\$ 15 000
Date de début du projet : mai 2006
Coordinateur : Abelmon Gesteira (UESC)

« **Estudo do genoma funcional do cacaueiro em respeito ao *Crinipellis pernicioso* e da ecologia e evolução do fungo** »

Financement: FAPESB
Valeur: R\$ 33 550
Date de début de projet: avril 2006
Coordinateur : José Luis Pires (CEPLAC)

« **Functional analysis of candidate genes for resistance of cacao to the pathogenic fungus *Crinipellis pernicioso*.** »

Financement: IFS.
Valeur: 12 000 USD
Date de début de projet: mai 2005 – mai 2008
Coordinateur : Abelmon Gesteira (UESC)

« **Genoma funcional de cacau** »

Financement : CNPq
Valeur : R\$ 30 000
Date de début du projet : mars 2004 – mars 2006
Coordinateur : José Luis Pires (CEPLAC)

« **Análise funcional de genes expressos diferencialmente na interação *Theobroma cacao*:*Crinipellis pernicioso*** »

Financement: FAPESB.
Valeur: R\$ 51 000
Période : octobre 2002-octobre 2005
Coordinateur : Abelmon Gesteira (UESC)

« Caracterização bioquímica e molecular da quitinase de *Crinipellis pernicioso*, o fungo causador da vassoura-de-bruxa do cacau »

Financement: CNPq.

Valeur: R\$ 19 000

Période: mars 2003-mars 2005

Coordinateur: Aritósteles Goes Neto (UEFS)

« Genoma do fungo *Crinipellis pernicioso*, agente causador da doença vassoura-de-bruxa no cacau »

Financement: SEAGRI/Estado da Bahia et CNPq.

Valeur: R\$ 529 000 (UESC)

Date de début de projet: novembre 2000

Coordinateur pour l'UESC: Júlio Cascardo (UESC)

6.6. ORGANISATION DU LABORATOIRE

De Biologie Moléculaire du Centro de Biotecnologia e Genética de l'UESC, Brésil

2008- Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire du *Centro de Biotecnologia e Genética* (CBG) de l'UESC

De Biologie Moléculaire des Relations Plantes-microorganismes, INRA, Toulouse

2002 Co-responsable des commandes de ³³P pour le laboratoire

2002 Co-responsable de l'approvisionnement du laboratoire en azote liquide

7. ENCADREMENT

7.1. ENCADREMENT DE STAGES (2nd cycle)

Au Laboratoire de Génomique et Expression Génique, UESC, Ilhéus, Brésil

- 2008 **Gabriela Costa Oliveira**, Maîtrise d'Agronomie, UESC, Ilhéus.
Thème : Prospeção de plantas para estabelecimento de um patossistema modelo da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*
Durée du stage : 6 mois
- 2008 **Thyago Hermylly Santana Cardoso**, Maîtrise de Biologie, UESC, Ilhéus.
Thème : Caracterização bioquímica de uma cisteína protease de cacau
Durée du stage : 6 mois
Financement : CNPq (PIBIC)
- 2008 **Nara Georgia Ribeiro Braz**, Maîtrise d'Agronomie, UESC, Ilhéus.
Thème : Otimização e validação de microssatélites (SSRs) oriundos de ESTs da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*
Durée du stage : 6 mois
Financement : CNPq (PIBIC)
- 2007 **André Luis Bomfim Pacheco**, DEUG de Biologie, UESC, Ilhéus.
Thème : Détermination de genes envolvidos na resistência do cacau ao *Crinipellis perniciosa* via arrays
Durée du stage : 7 mois, sans financement
- 2007 **Elisângela Alves dos Santos**, Licence d'Agronomie, UESC, Ilhéus.
Thème : Otimização e validação de microssatélites (SSRs) oriundos de ESTs da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*
Durée du stage : 6 mois
Financement : CNPq (PIBIC)
- 2006-2007 **Sanderson Tarciso Pereira de Sousa**, DEUG de Biologie, UESC, Ilhéus.
Thème : Expression heterologa de quitinases de *Crinipellis perniciosa*
Durée du stage : 1 an
Financement : UESC (Proiic)
- 2006-2008 **Glauce Cabral dos Santos**, Licence de Biomedecine, UESC, Ilhéus.
Thème : Estudo funcional de fatores de transcrição WRKY da interação cacau-*Crinipellis perniciosa*
Financement : FAPESB
- Août 2005- **Dayane Santos Gomes**, Maîtrise de Biologie, UESC, Ilhéus.
mars 2006 Thème : Análise molecular e bioquímica da regulation metabolica de quitinases do *Crinipellis perniciosa*
Durée du stage : 8 mois
Financement : UESC (Proiic)
- Mai-oct. **Sílvio Jesus dos Santos**, DEUG de Biologie, UESC, Ilhéus.
2005 Thème : Análise biochimica de proteases na interação cacau-*Crinipellis perniciosa*.
Durée du stage : 6 mois, sans financement
- 2004-2005 **Dayane Santos Gomes**, Licence de Biologie, UESC, Ilhéus.
Thème : Análise da expressão de um gene de quitinase do *Crinipellis perniciosa*
Durée du stage : 1 an
Financement : UESC (Proiic)

2004-2005 **Gílvia Simone de Andrade Oliveira**, DEUG de Biomédecine, UESC, Ilhéus.
 Thème : Análise do efeito da quitinase do *Crinipellis pernicioso* no crescimento de fungos fitopatogénos
Durée du stage: 1 an
Financement : UESC (Proic)

Au Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes, INRA, Toulouse

2001 **Nathalie Cirac**, Maîtrise de Biochimie option Biotechnologies, Université Paul Sabatier, Toulouse.
Thème: Analyse globale de l'expression d'une collection d'ESTs de *Medicago truncatula*
Durée du stage: 4 mois, sans financement

Au Laboratoire d'Enzymologie en Milieu Structuré, Institut Jacques Monod, Paris

1999 **Christian Gousset**, Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie, Université Paris 6.
Thème: Analyse biochimique des pectine méthylesterases dans la zone cambiale d'un peuplier transgénique altéré dans la biosynthèse de l'auxine
Durée du stage: 1 mois, sans financement

7.2. ENCADREMENT D'ETUDIANTS DE 3^{ème} CYCLE (Master et Doctorat de Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC – Durées respectives : 2 ans et 4 ans sauf « Candidats libres »)

Les encadrements effectués consistent en l'initiation pratique des étudiants au travail de laboratoire, à la direction des expériences ainsi qu'à la correction des rapports et soutenances occasionnés par les stages. La fonction d'encadrement s'étend également au montage de projets et à la recherche de financements permettant le bon fonctionnement des expériences effectuées par l'étudiant.

Comme encadrant principal

2008-	Doctorat	Heliana Argôlo Santos Carvalho <u>Thème d'études</u> : Caracterização bioquímica e molecular de pectinases de <i>Moniliophthora pernicioso</i> como pré-requisito a aplicações industriais. <u>Financement</u> : FAPESB
2008-	Doctorat	Rogério Mercês Ferreira Santos <u>Thème d'études</u> : Estudo molecular da interação cacau- <i>Ceratocystis cacaofunesta</i> . <u>Financement</u> : FAPESB
2007-	Doctorat	Lívia Santos Lima <u>Thème d'études</u> : Caracterização de genes da interação cacau- <i>Moniliophthora pernicioso</i> diferencialmente expressos em genótipos de cacau com diferentes fontes de resistência à vassoura-de-bruxa. <u>Financement</u> : FAPESB/CAPE
2007-	Master	Dayane Santos Gomes <u>Thème d'études</u> : Análise molecular e bioquímica da regulation metabolica de quitinasas do <i>Crinipellis pernicioso</i> . <u>Financement</u> : CAPES
2006-	Doctorat	Maíza Alves Lopes <u>Thème d'études</u> : Estudo funcional de fatores de transcrição WRKY da interação cacau- <i>Crinipellis pernicioso</i> . <u>Financement</u> : FAPESB

2006-2008	Master	<p>Braz Tavares da Hora Júnior <u>Thème d'études</u> : Determinação de genes envolvidos na resistência do cacau ao <i>Crinipellis pernicioso</i> via arrays. <u>Financement</u> : CAPES Master soutenu en mars 2008.</p>
Juil. 2006- Déc. 2006	Master « Candidat libre »	<p>Fátima Aparecida Ramos <u>Thème d'études</u> : Determinação de genes envolvidos na resistência do cacau ao <i>Crinipellis pernicioso</i> via arrays. <u>Durée du stage</u>: 6 mois, sans financement</p>
Avril 2006- Sept. 2006	Master « Candidat libre »	<p>Dayane Santos Gomes <u>Thème d'études</u> : Analyse biochimica de proteases na interação cacau-<i>Crinipellis pernicioso</i>. <u>Durée du stage</u>: 6 mois <u>Financement</u> : MAE</p>
2005-2007	Master	<p>Lívia Santos Lima <u>Thème d'études</u> : Identificação de polimorfismo em ESTs de cacau associados a interação cacau-<i>Crinipellis pernicioso</i>. <u>Financement</u> : CAPES Master soutenu en février 2007.</p>
2005-2007	Master	<p>Heliana Argôlo Santos Carvalho <u>Thème d'études</u> : Estudo funcional de cisteina proteases da interação cacau-<i>Crinipellis pernicioso</i>. <u>Financement</u> : CAPES Master soutenu en mars 2007.</p>
2003-2005	Master	<p>Maíza Alves Lopes <u>Thème d'études</u> : Estudo molecular de quitinasas de <i>Crinipellis pernicioso</i> (Stahel) Singer. <u>Financement</u> : FAPESB Master soutenu en août 2005.</p>

Comme co-encadrant ou conseiller

2007-2009	Master	<p>Aurizangela Oliveira de Sousa Medeiros <u>Thème d'études</u>: Estudos funcionais e expressão de genes envolvidos na qualidade da madeira via PCR tempo real. Co-encadrant. Master soutenu en février 2009.</p>
2005-2007	Master	<p>Cristiano Villela Dias <u>Thème d'études</u> : Genômica da Interação <i>Theobroma cacao</i> / <i>Crinipellis pernicioso</i>: Análise da expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e sua relação com resistência e, ou susceptibilidade. Co-encadrant. Master soutenu en mars 2007.</p>
2003-2005	Master	<p>Claudine Gonçalves de Oliveira <u>Thème d'études</u> : Diversidade genética da espécie de roedor <i>Chaetomys suspinosu</i> (ouriço-preto) para auxiliar na elaboração de seu plano de manejo. Conseiller. Master soutenu en juillet 2005.</p>
2003-2005	Master	<p>Dorival de Freitas Filho <u>Thème d'études</u> : Estudo dos transportadores ABC na detoxificação de <i>Crinipellis pernicioso</i>. Conseiller. Master soutenu en août 2005.</p>

2003-2005	Master	Stênio Carvalho Santos <u>Thème d'études :</u> Estudos da família multigênica de hidrofobinas no genoma do fungo <i>Crinipellis pernicioso</i> . Conseiller. Master soutenu en août 2005.
2003-2005	Master	Dahyana Santos Britto <u>Thème d'études :</u> Estudos funcionais de genes de codificam proteínas PR (pathogenesis related proteins) expressas em <i>Theobroma cacao</i> em resposta ao ataque de <i>Crinipellis pernicioso</i> . Co-encadrant. Master soutenu en août 2005.
2002-2004	Master	Geruza Ceita <u>Thème d'études :</u> Analise do processo de morte celular em <i>Theobroma cacao</i> L. induzido por <i>Crinipellis pernicioso</i> (Stahel) Singer. Co-encadrant. Master soutenu en août 2004.

7.3. FORMATION DE CHERCHEURS ET DE TECHNICIENS

2007-2008	Heliana Argôlo Santos Carvalho, UESC, Brésil Technicienne Biochimie et Proteomique <u>Thème :</u> Apoio aos estudos de bioquímica e proteômica da interação cacau- <i>Moniliophthora pernicioso</i> <u>Financement:</u> FAPESB
2004	Dr. Abelmon da Silva Gesteira, biologiste moléculaire, UESC, Brésil Accueil au sein du programme Biotrop, Cirad, Montpellier. Formation portant sur l'étude de l'expression de gènes sur macroarrays et sur le criblage de banque BAC. Formation de 6 semaines financée par le MAE et par une bourse DESI.

8. PUBLICATIONS

8.1. CHAPITRES DE LIVRES

- 2008 **Micheli F**, Gesteira A, Figueira A, Cascardo JCM. Biochemistry, genetic and molecular aspects of the interaction *Theobroma cacao* x *Moniliophthora perniciosa* - the witches' broom disease. In: *Theobroma cacao: Biology, Chemistry and Human Health*, Eds Bennett A, Keen C, Shapiro H, California University Press, Davis, USA. Soumis sur invitation.
- 2002 **Micheli F**, Ermel FF, Bordenave M, Richard L and Goldberg R. Cell walls of woody tissues: cytochemical, biochemical and molecular analysis of pectins and pectin methylesterases. In: *Wood formation in trees: developmental cell biology techniques*, Ed. NJ Chaffey, Harwood Academic Publishers. pp 179-200.
- 2000 **Micheli F**, Bordenave M and Richard L. Pectin methylesterases: possible markers for cambial derivative differentiation? In: *Cambium: the biology of wood formation*, Eds Savidge, Barnett and Napier, Bios scientific publishers. pp 295-304.

8.2. ARTICLES

Articles dans des revues internationales avec comité de lecture² (les noms des étudiants de Master/Doctorat sous ma responsabilité sont soulignés) :

- 2009 Pungartnik C, Silva AC, Melo SA, Gramacho K, Cascardo JCM, Brendel M, **Micheli F**, Gesteira AS. High-affinity copper transport and Snq2 export permease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22: 39-51 (Facteur d'impact: 4.275).
- 2008 Lima LS, Gramacho KP, Gesteira AS, Lopes UV, Gaiotto FA, Zaidan HA, Pires JL, Cascardo JCM, **Micheli F**. Characterization of microsatellites from cacao-*Moniliophthora perniciosa* interaction expressed sequence tags. *Molecular Breeding*, 22: 315-318 (Facteur d'impact: 2.357).
- 2008 Pirovani CP, Carvalho HAS, Machado R, Gomes DS, Alvim FC, Pomella AWW, Gramacho K, Cascardo JCM, Pereira G, **Micheli F**. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, 29: 2391-2401 (Facteur d'impact: 3,609).
- 2008 Siedlecka A, Wiklund S, Peronne A-M, **Micheli F**, Les'niewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz E. Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiology*, 146: 554-565 (Facteur d'impact : 6.367).
- 2008 Lopes MA, Gomes DS, Koblitz MGB, Pirovani CP, Cascardo JCM, Góes-Neto A, **Micheli F**. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*. *Mycological Research*, 112: 399-406 (Facteur d'impact: 1.861).
- 2007 Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB, Alemanno L, Gesteira AS, **Micheli F**, Mariano AC, Gramacho KP, Silva DC, Meinhardt L, Mazzafera P, Pereira GAG, Cascardo JCM. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora perniciosa*. *Plant Science*, 173:106-117. (Facteur d'impact: 1.795)
- 2007 Gesteira A*, **Micheli F***, Carels N, Silva AC, Gramacho KP, Schuster I, Macedo JN, Pereira GAG, Cascardo JCM. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora perniciosa*. *Annals of Botany*, 100 :129-140. (Facteur d'impact: 2.939)

² JCR2007

* Premiers auteurs joints

- 2007 Garcia O, Macêdo J, Tiburcio R, Zapparoli G, Rincones J, Bittencourt L, Ceita G, **Micheli F**, Gesteira A, Mariano A, Schiavinato M, Medrano FJ, Meinhardt L, Pereira G, Cascardo J. Characterization of necrosis and ethylene inducing proteins (NEP) in the hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora perniciosa* the causal agent of the witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, 111:443-455. (Facteur d'impact: 1.861)
- 2007 Godiard L, *Niebel A*, **Micheli F**, Gouzy J, Ott T, Gamas P. Identification of new potential regulators of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis using a large scale Suppression Subtractive Hybridization approach. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 20: 331-332. (Facteur d'impact: 4.275)
- 2003 Gesteira A, **Micheli F**, Ferreira CF, Cascardo J. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosa*. *BioTechniques*, 35: 494-500. (Facteur d'impact: 2.759)
- 2002 Journet E-P, van Tuinen D, Gouzy J, Crespeau H, Carreau V, Farmer M-J, Niebel A, Schiex T, Jaillon O, Chatagnier O, Godiard L, **Micheli F**, Kahn D, Gianinazzi-Pearson V, Gamas P. Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research*, 30: 5579-5592. (Facteur d'impact: 6,954)
- 2001 **Micheli F**. Pectin methylesterases : cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6 : 414-419. (Facteur d'impact: 8,995)
- 2000 **Micheli F**, Sundberg B, Goldberg R, Richard L. Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiology*, 124: 191-199. (Facteur d'impact: 6.367)
- 1998 **Micheli F**, Holliger C, Goldberg R, Richard L. Characterisation of the pectin methylesterase-like gene *AtPME3*: a new member of a gene family comprising at least twelve genes in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 220: 13-20. (Facteur d'impact: 2.871)

Articles dans des revues internationales sans comité de lecture:

- 2004 Gesteira A, **Micheli F**, Gramacho K, Alvim F, Pirovani C, Pires A, Mariano A, Carels N, Pires J-L, Vincentz M, Pereira G and Cascardo J. Understanding the *Theobroma cacao*-*Crinipellis perniciosa* interaction using ESTs and proteomic analyses. *Ingenic Newsletter*, 9: 27-32.

Articles soumis ou accepté:

- 2009 Hora Junior BT*, **Micheli F***, Lopes MA, Dias CV, Gramacho KP, Sabau X, Mauro SMZ, Cascardo JCM, Gesteira AS. Large scale expression analysis of cacao-*Moniliophthora perniciosa* interaction. Soumis à *Annals of Botany* (Facteur d'impact: 2.939).
- 2009 Lima L, Gramacho K, Carels N, Novais R, Gaiotto F, Lopes U, Gesteira A, Zaidan H, Cascardo J, Pires JL, **Micheli F**. Single Nucleotide Polymorphisms from *Theobroma cacao* Expressed Sequence Tags: new expectations for cacao breeding. Soumis à *Genetics and Molecular Research* (Facteur d'impact: 1.05).

Articles en préparation:

- 2009 **Micheli F**, Mellerowicz E, Gousset C, Richard L and Sundberg B. Analysis of pectin methylesterases in transgenic hybrid aspen altered in wood characteristics. Soumission prévue à *Physiologia Plantarum*.

* Premiers auteurs joints

- 2009 Pirovani CP, Santiago AS, dos Santos LS, **Micheli F**, Margis R, Alvim FC, Pereira GAG, Cascardo JCM. Characterization of four new cacaocystatin that inhibit hyphae growth of *Moniliophthora perniciosa*. Soumission prévue à *New Phytologist*.
- 2009 Lima LS, Gramacho K, Gaiotto F, Lopes U, Pires JL, Gesteira A, Cascardo J, Lima L, **Micheli F**. Development and analysis of SSR from cacao ESTs. Soumission prévue à *TAG*.
- 2009 Gramacho K, Lima LS, **Micheli F**. Comparative analysis of cacao EST in infected fruit and meristem. Soumission prévue à *Plant Cell Reports*.
- 2009 Carels N, Vidal R, Gesteira A, **Micheli F**, Frías D, Cascardo J and Pereira G. The determination of codon usage in *Theobroma cacao* and *Crinipellis perniciosa* using ESTs. Soumission prévue à *MPP*.

Résumés dans des revues internationales à comité de lecture suite à des congrès:

- 1999 **Micheli F**, Ermel FF and Richard L. Pectin methylesterases as possible markers for cambial derivative differentiation. *Journal of Experimental Botany*, 50: 27. (Facteur d'impact: 2.852)

8.3. TRAVAUX AYANT FAIT L'OBJET D'UNE PARUTION DANS LES BANQUES DE DONNEES DE SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES (EMBL-GENBANK-DDBJ BATABANK LIBRARY)

- 2007 Gesteira A, **Micheli F**, Carels N, Gramacho K and Cascardo J.
Genbank -ES439783-ES440989 ESTs *Theobroma cacao* (Catongo)-*Moniliophthora perniciosa*
Genbank -ES440990-ES442709 ESTs *Theobroma cacao* (TSH1188)-*Moniliophthora perniciosa*
- 2006 Gesteira A, Carels N, **Micheli F** and Cascardo J.
Genbank-EF140885 ADNc 18S Protein *Theobroma cacao*
Genbank-EF114673 ADNc Necrosis and Ethylene Inducing Protein *Theobroma cacao* TcNEP2
Genbank-ET191355 ADNc Oxalate oxidase *Theobroma cacao*
- 2005 Godiard L, Niebel A, **Micheli F**, Gouzy J and Gamas P.
Genbank-AJ845978-AJ846265 MtSC4 SSH library
Genbank-AJ845245-AJ845970 MtSNF SSH library
Genbank-AJ846898-AJ847350 MtSTW SSH library
Genbank-AJ847919-AJ848801 MtSN4 SSH library
Genbank-AJ846292-AJ846578 MtSCF SSH library
Genbank-AJ847417-AJ847852 MtSTA SSH library
Genbank-AJ846579-AJ846848 MtSN0 SSH library
- 2000 **Micheli F**
EMBL-AJ277547 ADNc Pectine méthylestérase *P. tremula* (L.) x *P. tremuloides* (Michx) *PttPME1*
EMBL-AJ292974 ADNc Pectine méthylestérase *P. tremula* (L.) x *P. tremuloides* (Michx) *PttPME2*
EMBL-AJ292975 ADNc Pectine méthylestérase *P. tremula* (L.) x *P. tremuloides* (Michx) *PttPME3*
EMBL-AJ292976 ADNc Pectine méthylestérase *P. tremula* (L.) x *P. tremuloides* (Michx) *PttPME4*
- 1998 Richard L, **Micheli F** et Goldberg R.
EMBL-AF077855 ADN génomique Pectine méthylestérase *A. thaliana* (L.) *AtPME4*
- 1998 **Micheli F** et Richard L.
EMBL-AF033205 ADN génomique Pectine méthylestérase *A. thaliana* (L.) *AtPMEpcrA*
EMBL-AF033206 ADN génomique Pectine méthylestérase *A. thaliana* (L.) *AtPMEpcrB*
EMBL-AF033207 ADN génomique Pectine méthylestérase *A. thaliana* (L.) *AtPMEpcrC*

8.4. PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES ET CONGRES

Communication orale sur invitation :

- 2008 **Micheli F.** Genômica da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*. 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brésil.
- 2005 **Micheli F.** O cacau no Cirad. Workshop Vassoura de Bruxa. Ilhéus, Bahia, Brésil.
- 1999 **Micheli F.** Pectin methylesterases: possible markers for cambial derivative differentiation. Annual meeting of the Society for Experimental Biology, Edinburgh, Scotland.

Communications orales (le nom de l'auteur avant effectué la presentation est souligné) :

- 2007 Gesteira A, **Micheli F**, Carels N, Cascardo J. Biology of *Theobroma cacao-Crinipellis perniciosa* interaction: lessons from genomics and post-genomics. I Sympósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas. Natal-RN, Brasil.
- 2006 Lanaud C, Fouet O, Gramacho K, Argout X, Legavre T, Sabau X, Risterucci A-M, Vincker P, da Silva C, Loores G, Lopes U, Cascardo J, Courtois B, Khun D, Schnell R, Bailey B, Babin R, Sounigo O, Ducamp M, Paulin D, Debert P, Verica J, Guiltinan M, Alemanno L, Machado R, Phillips W, **Micheli F**, Clement D, Butler D, Rosenquist E, Gilmour M, Glaszmann J-C. Producing and sequencing of a large collection of cocoa cDNA isolated from various organs and under various biotic and abiotic stresses. 15th International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica.
- 2006 Cascardo JCM, Gesteira AS, **Micheli F**, Carels N, Pereira GAG. Thoughts on Crinipellis: defeating the disease that destroyed Brazil's cocoa crop. Symposium on Cocoa, The National Academies, Washington, DC, USA.
- 2005 Gomes DS, Lopes MA, Oliveira GSA, Santos SC, Pires ABL, Neto AG, **Micheli F**. Análise da expressão de um gene de quitinase de *Crinipellis perniosa*. 11º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus-BA, Brésil.
- 2005 Gesteira A, **Micheli F**, Pereira G e Cascardo J. Interação fungo-planta no estabelecimento da vassoura de bruxa. XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília, Brésil.
- 2004 Pirovani C, Lopes M, Oliveira B, Dias C, Caldas E, da Hora Junior B, Souza C, Galante R, Santos Junior M, Silva B, Uetanabaro A, Taranto A, Cruz S, Roque M, **Micheli F**, Gesteira A, Schrieffer A, Cascardo J, Pereira G, Góes Neto A. Knowledge discovery in genome database: the chitin metabolic pathway in *Crinipellis perniciosa* (stahel) singer. International Conference on Bioinformatics and Computational Biology and IV Brazilian Symposium on Mathematical and Computational Biology, Ilhéus-BA, Brazil.
- 2004 Gesteira A, **Micheli F**, Gramacho K, Alvim F, Pirovani C, Pires A, Mariano A, Carels N, Suarez D, Pires J, Vincentz M, Pereira G, Cascardo J. Pós genômica da interação planta-patogeno: Estudo do caso *Theobroma cacao -Crinipellis perniciosa*. 55 Congresso Brasileiro de Botânica, Viçosa-MG, Brazil.
- 2004 Gesteira A, **Micheli F**, Pirovani C, Alvim F, Pires A, Neuby J, Ceita G, Silva A, Motta T, Filho J, Vidal R, Gramacho K, Carels N, Frias D and Cascardo J. Depicting the plant-pathogen interaction *Theobroma cacao-Crinipellis perniciosa* using genomics and proteomics tools. Cacao symposium : *Theobroma cacao*: ancient crop, medicinal plant, surprising future, Washington, USA.
- 2003 Mellerowicz E, Nishikubo N, Siedlecka A, Gray-Mitsumune M, Péronne M-A, Bourquin V, **Micheli F**, Richard L, McQueen-Mason S, Brumer H, Teeri TT, Sundberg B. Custom- tailored wood fibers. Tree Biotechnology Meeting, Umea, Sweden.
- 2003 Gesteira A, **Micheli F**, Gramacho K, Pires JL and Cascardo J. Exploring the plant-pathogen interaction *Theobroma cacao-Crinipellis perniciosa* using random sequencing and SAGE analysis. 14th International Cocoa Research Conference, Accra, Ghana.

- 2002 Siedlecka A, Péronne M-A, Lesniewska J, Richard L, **Micheli F**, Shchukarev A, McCann M, Bush M, Sundberg B and Mellerowicz E. Altered expression of Pectin Methyl Esterase PME1 causes multiple changes in the aspen wood-forming tissues. COST E20 meeting Cell Wall and Stress, INRA, Reims, France.
- 2002 Niebel A, Godiard L, **Micheli F**, Heller G, Roy M and Gamas P. Suppression subtractive hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. 5th European Nitrogen Fixation Conference Norwich, England.
- 2002 Godiard L, Niebel A, Gouzy J, El Yahyaoui F, van Tuinen D, Carreau V, **Micheli F**, Crespeau H, Jaillon O, Heller G, Chatagnier O, Gianinazzi-Pearson V, Kahn D, Journet E-P and Gamas P. EST analysis to explore the root *Medicago truncatula* symbiotic program. 10th New Phytologist Symposium, Functional Genomics of Plant-Microbe Interactions, Nancy, France.
- 2002 **Micheli F**, Godiard L, Niebel A, Gouzy J, van Tuinen D, Carreau V, Crespeau H, Jaillon O, Heller G, Chatagnier O, Gianinazzi-Pearson V, Kahn D, Journet E-P and Gamas P. EST analysis and Suppression Subtractive Hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. First International Conference on Legume Genomics and Genetics : translation to crop improvement, St Paul, Minneapolis, USA.
- 2002 Godiard L, **Micheli F**, Niebel A, Heller G, Sauviac L, Debellé F and Gamas P. Génomique fonctionnelle du programme symbiotique précoce de *Medicago truncatula* : l'approche SSH. Journée Intragénopôle, INSA Toulouse, France.
- 2002 Godiard L, Niebel A, **Micheli F**, Cirac N, Debellé F et Gamas P. Exploration du transcriptome de *Medicago truncatula* lors de la symbiose fixatrice d'azote par l'approche d'hybridation suppressive soustractive. ATS INRA *Medicago truncatula*, Rennes, France.
- 2001 **Micheli F**. Involvement of pectin methylesterases in cambial derivative differentiation. 9th Cell Wall Meeting, Toulouse, France.
- 2001 Niebel A, Godiard L, **Micheli F**, Gouzy J, Carreau V, Journet E-P et Gamas P. Exploration par génomique fonctionnelle du programme symbiotique précoce de *Medicago truncatula*. Journée Intragénopôle, INSA Toulouse, France.

Communications par affiche (posters) :

- 2008 Medeiros AOS, Dias CV, Breton M, Pasquale G, **Micheli F**, Costa MGC, Cascardo JCM. Validação via qRT-PCR da expressão de genes relacionados à qualidade da madeira em Eucalyptus. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brasil.
- 2008 Santos RMF, Gramacho KP, Lopes UV, Argout X, Fouet O, Legavre T, Silva SDM, Lanaud C, **Micheli F**. Geração de ests e identificação de marcadores SSR na interação cacau-*Ceratocystis cacaofunesta*. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brasil.
- 2008 Carvalho HAS, Gesteira AS, Pirovani CP, Cascardo JCM, **Micheli F**. Do genoma ao proteoma: uma adaptação do protocolo de extração de ácidos nucleicos do cacau, para se estabelecer um novo protocolo de extração de proteínas nativas de meristemas e folhas de cacaueiros. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brasil.
- 2008 Cardoso THS, Pungartnik C, **Micheli F**, Cascardo JCM, Brendel M, Gesteira AS. Pathogenesis-related protein of *Theobroma cacao* is transported via high-affinity copper transporter of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brasil.
- 2008 Oliveira TM, Villela Dias C, **Micheli F**, Costa MGC. Identificação de mecanismos de resposta adaptativa à seca em citros baseada em análise *in silico* do transcriptoma. 54^o Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brasil.

- 2008 Lima SL, Gramacho KP, Lima L, Paternostro GC, dos Santos EA, Braz NGR, Lopes UV, Gaiotto FA, Clement D, Gesteira AS, Cascardo JCM, Pires JL, **Micheli F**. Análise comparativa de SSR genômicos e SSR-ESTS visando associação de genes de resistência a vassoura-de-bruxa no cacau. 54º Congresso Brasileiro de Genética. Salvador-BA, Brésil.
- 2007 Melo SA, Silva AC, Cardoso TH, Pungartnik C, Gramacho K, **Micheli F**, Brendel M, Cascardo JCM, Gesteira AS. A pathogenesis related protein, TcPR10 from *Theobroma cacao*: mechanism of actions against fungi. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Hora Júnior BT, Gesteira AS, Gramacho KP, Cascardo JCM, Di Mauro SZ, Ferro MIT, **Micheli F**. Expressão gênica da interação *Moniliophthora perniciosa*-*Theobroma cacao* via macroarray. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Gomes DS, Lopes MA, Pirovani CP, Koblitz MGB, Cascardo JCM, Góes-Neto A, **Micheli F**. Quitinases de *Moniliophthora perniciosa*, o agente causal da doença vassoura de bruxa do cacau: bons alvos para o controle da doença. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Carvalho HAS, Gomes DS, Cascardo JCM, Costa MG, Gesteira AS, **Micheli F**. Análise bioquímica e molecular de proteases na interação *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Lima LS, Gramacho KP, Gaiotto FA, Lopes UV, Pires JL, Gesteira AS, Cascardo JCM, Lima L, **Micheli F**. Identificação de microssatélites em ESTs de cacau associados à interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Lopes MA, Santos GC, Gesteira AS, Gramacho KP, Cascardo JCM, **Micheli F**. Expressão diferencial dos fatores de transcrição da interação *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Villela-Dias C, Hora Júnior BT, Lopes MA, Santos SC, Gesteira A, **Micheli F**, Gramacho K, Cascardo JCM. Análise de macroarranjos de duas variedades de *Theobroma cacao*: um perfil de expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brasil.
- 2007 Melo SA, Silva AC, Pungartnik C, **Micheli F**, Cascardo JCM, Gesteira AS. A pathogenesis related protein, TcPR10 from *Theobroma cacao* with antifungal activity against *Moniliophthora perniciosa*. XIII International Congress of Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italie.
- 2007 Lima LS, Gramacho KP, Lopes UV, Gesteira AS, Carels N, Novais R, Zaidan HA, Cascardo JCM, **Micheli F**. Molecular markers detected on ESTs from cacao-*Moniliophthora perniciosa* interaction: the use of genomic tools to improve breeding against witches' broom disease. XIII International Congress of Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italie.
- 2007 Da Hora Júnior BT, Gesteira AS, Gramacho KP, Cascardo JCM, Di Mauro SMZ, **Micheli F**. Large scale expression analysis of sequences from *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* interaction. XIII International Congress of Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italie.
- 2007 Gomes DS, Lopes MA, Pirovani CP, Koblitz MAB, Cascardo JCM, Góes-Neto A, **Micheli F**. Chitinases from *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: good targets for control disease. XIII International Congress of Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italie.
- 2007 Pacheco ALB, da Hora Júnior BT, Gramacho K, Cascardo JCM, Gesteira AS, **Micheli F**. Análise de expressão de genes por hibridização de macroarranjos de cDNA da interação cacau-*Moniliophthora perniciosa*. 13º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus, Brésil.
- 2007 França DS, **Micheli F**, Pungartnik C, Cascardo JCM, Gesteira A. Análise bioquímica e funcional do gene Bax inibidor 1 isolado da interação entre *Theobroma cacao* e *Moniliophthora perniciosa*. 13º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus, Brésil.
- 2006 Silva JPC, **Micheli F**, Bendel M, Pungartnik C. Caracterização fenotípica de mutantes de levedura *mca1Δ* e *rim 13Δ* com atividade de cisteína protease. 12º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus, Brésil.

- 2006 França DS, **Micheli F**, Pungartnik C, Cascardo JCM, Gesteira A. Análise bioquímica e funcional do gene Bax inibidor 1 isolado da interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis pernicioso*. 12º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus, Brésil.
- 2006 Dias CV, Mendes JS, **Micheli F**, Gesteira AS, Pirovani CP, Mazzafera P, Hammerstone JF, Cascardo JCM. Análise bioquímica e molecular do estresse oxidativo em cacau infectado com *Crinipellis pernicioso*. 52º Congresso Brasileiro De Genética, Foz do Iguaçu, Brésil.
- 2006 Andrade Junior SJ, Sousa LA, Vidal R, Gesteira AS, **Micheli F**, Cascardo JCM, Garcia D. Genes prováveis de resistência envolvidos na interação *Hevea – Microcyclus ulei*. 52º Congresso Brasileiro De Genética, Foz do Iguaçu, Brésil.
- 2006 Melo, SA, Silva JC, Silva AC, Pungartnik C, Gramacho K, **Micheli F**, Cascardo JCM, Gesteira AS. Análise da atividade antifúngica da proteína PR-10 da interação *Theobroma cacao-Crinipellis pernicioso*. 52º Congresso Brasileiro De Genética, Foz do Iguaçu, Brésil.
- 2006 Lima SL, Gramacho KP, Gesteira A, Carels N, Cascardo J, **Micheli F**. Análise bioinformática para detecção de polimorfismo de base única em bibliotecas de interação cacau-*Crinipellis pernicioso*. 52º Congresso Brasileiro De Genética, Foz do Iguaçu, Brésil.
- 2006 Lopes MA, Gomes DS, Carvalho SS, Pires ABL, Pirovani CP, Gesteira AS, Gramacho KP, Koblitz MGB, Góes-Neto A, Cascardo JCM, **Micheli F**. Biochemical and molecular characterization of chitinases from *Crinipellis pernicioso*. 15th International Cocoa Research Conference, San José, Costa Rica.
- 2006 Silva JPC, Basso TS, **Micheli F**, Brendel M, Pungartnik C. Caracterização fenotípica de mutantes de levedura *Saccharomyces cerevisiae* com objetivo de expressão heteróloga de uma cisteína protease de *Theobroma cacao*. 25º Reunião de Genética de Microorganismos, São Pedro-SP, Brésil.
- 2005 Sousa LA, Mattos CRS, Cascardo JCM, **Micheli F**, Pujade-Renaud V, Garcia D. Caracterização da resistência ao mal-das-folhas de dois genótipos de seringueira em condições controladas de infecção e construção de bibliotecas de cDNA à partir das folhas. 11º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus-BA, Brésil.
- 2005 Oliveira GSA, Lopes MA, Gomes DS, Pirovani CP, Neto AG, **Micheli F**. Expressão heteróloga e análise enzimática de quitinases de *Crinipellis pernicioso*. 11º Seminário de Iniciação Científica da UESC, Ilhéus-BA, Brésil.
- 2005 Neuby J, Cabrera O, Bittencourt L, **Micheli F**, Gesteira A, Pereira G, Cascardo J. Caracterização funcional dos indutores de necrose de *Crinipellis pernicioso* em *Theobroma cacao* L. e *Nicotiana tabacum* L. 51º Congresso Brasileiro De Genética, Aguas de Lindoia, SP, Brésil.
- 2005 Santos S, Santos T, Lopes M, Brittos D, Mariano A, Pires A, Pirovani C, **Micheli F**, Gesteira A, Cascardo J. As hidrofobinas de *Crinipellis pernicioso* são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do fungo e colonização de tecidos de cacau. 51º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia-SP, Brésil.
- 2005 Lopes MA; Gomes DS; Oliveira, GSA; Santos SC; Britto DS; Pires, ABL; Pirovani, CP; Gesteira, AS; Gramacho, KP; Góes-Neto, A; Cascardo, JCM; **Micheli F**. Caracterização molecular de quitinase de *Crinipellis pernicioso*. 51º Congresso de Genética Brasileira, Aguas de Lindoais-SP, Brésil.
- 2005 Britto DB; Lopes MA; Santos SC; **Micheli F**; Alvim FC; Cascardo JCM; Gesteira, AS. Análise funcional do gene de glicanase (PR-2) isolado de uma biblioteca de cDNA da interação entre *Theobroma cacao* e *Crinipellis pernicioso*. 51º Congresso de Genética Brasileira, Aguas de Lindoais-SP, Brésil.
- 2005 Zaidan HA, Gesteira A, **Micheli F**, Ceita GO, Cascardo J, Carels N, Braz NG, Serra WO, Gramacho K and Lopes UV. Caracterização molecular da resistência do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) a vassoura de bruxa. XXXVIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Brasília, Brésil.

- 2005 Gesteira A, Silva A, **Micheli F**, Dias R, Carels N, Macêdo J, Ceita G, Gramacho K, Frias D and Cascardo J. Comparative analyses of resistant and susceptible *Theobroma cacao*-*Crinipellis pernicios*a interactions using ESTs. XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Merida, Mexique.
- 2005 **Micheli F**, Ceita G, Macêdo J, Santos T, Alemanno L, Gesteira A, Mariano A, Gramacho K, Silva D, Pereira G and Cascardo J. Susceptibility of *Theobroma cacao* to *Crinipellis pernicios*a: a programmed cell death triggered by calcium oxalate degradation. XII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Merida, Mexique.
- 2004 Siedlecka A, Péronne A-M, **Micheli F**, Richard L, Sundberg B and Mellerowicz E. Pectin methyl esterase regulates fiber length in poplar by acting on intrusive tip growth. Swedish Forest Biotechnology Conference, Stockholm, Sweden.
- 2004 Santos T, Ceita G, Neuby J, Bittencourt L, Silva D, Gramacho K, Mariano A, **Micheli F**, Pereira G e Cascardo J. Caracterização do processo de morte celular na interação *Theobroma cacao*/*Crinipellis pernicios*a. 50º Congresso Brasileiro de Genética, Florianópolis, Brésil.
- 2004 Godiard L, Niebel A, El Yahyaoui F, **Micheli F**, Ben Amor B , Gough C, Vernié T, Turchetti A, de Billy F, Gouzy J and Gamas P. Large scale expression profiling and Suppression Subtractive Hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. 2nd EPSO Conference - In honour of Jeff Schell. Interactions in Plant Biology: cells, plants and communities, Ischia, Italy.
- 2004 Ceita G, Neuby J, Bittencourt L, Santos T, Pirovani C, Gramacho K, Garcia O, Dias R, Mariano A, Gesteira A, **Micheli F**, Pereira G e Cascardo J. Analise do indutor de necrose expresso durante a interação *Theobroma cacao*/*Crinipellis pernicios*a. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Gramado, Brésil.
- 2004 Neuby J, Ceita G, Bittencourt L, Santos T, Alvim F, Gramacho K, Dias R, Mariano A, Gesteira A, **Micheli F**, Pereira G e Cascardo J. Caracterização molecular do gene que codifica para uma proteína indutora de necrose *Crinipellis pernicios*a. 55º Congresso Nacional de Botânica, Viçosa, Brésil.
- 2004 Silva A, Gesteira A, **Micheli F**, Neuby J, Ceita G, Gramacho K, Motta T, Filho J, Vidal R, Carels N, Frias D and Cascardo J. Depicting the plant-pathogen interaction *Theobroma cacao*-*Crinipellis pernicios*a using genomics tools. 50º Congresso Brasileiro de Genética, Florianópolis, Brésil.
- 2004 Britto D, Lopes M, Sperotto R, Dias R, Góes Neto A, Gesteira A, **Micheli F**, Mariano A, Gramacho K, Pirovani C, Alvim F e Cascardo J. Estudos funcionais de genes envolvidos na interação *Theobroma cacao*:*Crinipellis pernicios*a. 55º Congresso Nacional de Botânica, Viçosa, Brésil.
- 2004 Ceita G, Santos S, Neuby J, Pirovani C, Dias R, Mariano A, Pires A, Gesteira A, **Micheli F**, Alvim F e Cascardo J. Hidrofobinas do fungo *Crinipellis pernicios*a são detectáveis em ramos infectados de cacau e pertencem a uma família multigênica. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Gramado, Brésil.
- 2004 Godiard L, Niebel A, El Yahyaoui F, **Micheli F**, Billy F, Vernié T, Turchetti A, Gouzy J and Gamas P. Large scale expression profiling and suppression subtractive hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. 6th European Nitrogen Fixation Conference, Toulouse, France.
- 2003 Siedlecka A, Péronne MA, **Micheli F**, Richard L, Sundberg B and Mellerowicz E. Pectin methyl esterases fibre length in poplar by acting on intrusive tip growth. Tree Biotechnology Congress, Umeå, Suède.
- 2003 Niebel A, Godiard L, **Micheli F** and Gamas P. Suppression Subtractive Hybridization to explore the *Medicago truncatula* Symbiotic program. 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, St.-Petersburg, Russie.
- 2003 Godiard L, Niebel A, Lelant A, **Micheli F** and Gamas P. Suppression Subtractive Hybridization to explore the *Medicago truncatula* Symbiotic program. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelone, Espagne.

- 2003 Gesteira A, **Micheli F**, Gramacho K, Pires JL and Cascardo J. Exploring the plant-pathogen interaction *Theobroma cacao-Crinipellis perniciosa* using EST analysis. 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelone, Espagne.
- 2002 Godiard L, Niebel A, **Micheli F**, Roy M, Heller G and Gamas P. Suppression Subtractive Hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. 10th New Phytologist Symposium, Functional Genomics of Plant-Microbe Interactions, Nancy, France.
- 2001 Godiard L, Niebel A, **Micheli F**, Carreau V, Gouzy J, Journet E-P and Gamas P. EST analysis and suppression subtractive hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. 10th International Congress on Molecular Plant Microbe Interactions, Madison, USA.
- 2001 **Micheli F**, Godiard L, Niebel A, Carreau V, Gouzy J, Journet E-P and Gamas P. EST analysis and suppression subtractive hybridization to explore the *Medicago truncatula* symbiotic program. Journées de l'IFR-40, INRA-USP-ENSAT, Toulouse, France.
- 2000 **Micheli F**, Sundberg B et Richard L. Distribution des pectine méthylestérases dans les tissus de la tige du peuplier. Journées paroi du Réseau Français des Parois, Versailles, France.
- 2000 Bordenave M, **Micheli F**, Richard L et Goldberg R. Etude des pectine méthylestérases au cours de la différenciation cambiale chez le peuplier (*Populus tremula x tremuloides*). Journées paroi du Réseau Français des Parois, Versailles, France.
- 2000 **Micheli F**, Carter C, Goodenough P et Richard L. Analyse moléculaire d'un gène de pectine méthylestérase de peuplier. Les 9^{èmes} Journées de l'UFR des Sciences de la Vie, Université Paris 6, Paris, France.
- 2000 Bordenave M, **Micheli F**, Richard L et Goldberg R. Analyse biochimique et purification d'isoformes de pectine méthylestérases de peuplier (*Populus tremula x tremuloides*). Les 9^{èmes} Journées de l'UFR des Sciences de la Vie, Université Paris 6, Paris, France.
- 1999 **Micheli F** et Richard L. Etude de la distribution des pectine méthylestérases dans la zone cambiale du peuplier. Les 8^{èmes} Journées de l'UFR des Sciences de la Vie, Université Paris 6, Paris, France.
- 1998 **Micheli F**, Richard L, Catesson A-M and Goldberg R. Molecular study of the role of pectin methylesterases in cambial differentiation in *Populus tremula x tremuloides*. Eighth Cell Wall Meeting, Norwich, England.
- 1998 Richard L, **Micheli F**, Holliger C and Goldberg R. Characterisation of the pectin methylesterase-like gene *AtPME3*: a new member of a gene family comprising at least twelve genes in *Arabidopsis thaliana*. Eighth Cell Wall Meeting, Norwich, England.
- 1998 **Micheli F**, Richard L, Catesson A-M et Goldberg R. Etude moléculaire du rôle des pectine méthylestérases dans la différenciation cambiale chez *Populus tremula x tremuloides*. Les 7^{èmes} Journées de l'UFR des Sciences de la Vie, Université Paris 6, Paris, France.
- 1998 Richard L, **Micheli F** et Goldberg R. Caractérisation moléculaire de la famille de gènes codant les pectine méthylestérases chez *Arabidopsis thaliana*. Les 7^{èmes} Journées de l'UFR des Sciences de la Vie, Université Paris 6, Paris, France.

8.5. SEMINAIRES

- 2008 « *Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa* ». Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad), Montpellier, France.
- 2001 « Les pectine méthylestérases dans la différenciation des dérivées cambiales chez le Peuplier ». Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV), Grenoble, France (Invitation : Pr. Serge Perez).

- 2000 « Etude moléculaire et biochimique des pectine méthylestérases chez le Peuplier ». Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP), Strasbourg, France (Invitation : Pr. Bernard Fritig).
- 1997 « Stratégie d'isolement de mutants de pectine méthylestérases d'*Arabidopsis thaliana* par *T-DNA tagging PCR* ». Département de Biologie Supramoléculaire et Cellulaire de l'Institut Jacques Monod (IJM), Paris, France.

8.6. AUTRES TYPES DE DOCUMENTS

Thèse de doctorat :

"Etude moléculaire et biochimique des pectine méthylestérases dans la différenciation cambiale chez le peuplier"

Thèse soutenue le 11 décembre 2000, à l'Université Paris 6, devant la commission d'examen :

Président : Pr. E Miginiac (Université Paris 6)

Rapporteurs : Pr. A.-M. Boudet (Université Paul Sabatier, Toulouse)
Dr. Y. Meyer (CNRS, Perpignan)

Examineurs : Dr. S. Perez (CERMAV, Grenoble)
Dr. L. Richard (Université Paris 6)
Pr. R. Goldberg (Université Paris 6- Directeur de la thèse)

Rapports d'activités et de missions :

- 2007 **Micheli F.**, Clement D. Bases génétiques de la résistance du cacaoyer à la maladie du balai de sorcière (*Moniliophthora perniciosa*) : [2005-07]. In : Le Cirad au Brésil : rapport d'activités 2003-2004. Brasilia : CIRAD, p. 10-12.
- 2007 **Micheli F.**, Clement D. Bases genéticas da resistência contra a vassoura da bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) : [2005-07]. In : O Cirad no Brasil : relatório de atividades 2003-2004. Brasilia : CIRAD, p. 10-12.
- 2005 **Micheli F.**, Clement D. Bases génétiques de la résistance du cacaoyer à la maladie du balai de sorcière (*Crinipellis perniciosa*) : [2003-04]. In : Le Cirad au Brésil : rapport d'activités 2003-2004. Brasilia : CIRAD, p. 13-15.
- 2005 **Micheli F.**, Clement D. Bases genéticas da resistência contra a vassoura da bruxa (*Crinipellis perniciosa*) : [2003-04]. In : O Cirad no Brasil : relatório de atividades 2003-2004. Brasilia : CIRAD, p. 13-15.
- 2004 **Micheli F.** Accueil et encadrement du chercheur Abelmon Gesteira (bourse DESI) dans le cadre de l'étude de l'interaction cacao-*Crinipellis* : rapport de mission à Montpellier, France du 20 juin au 31 juillet 2004. Montpellier : CIRAD-CP, [5] p. CP-SIC 1745.
- 2003 **Micheli F.** Bases génétiques de la résistance du cacaoyer à la maladie du balai de sorcière (*Crinipellis perniciosa*) : [2001-02]. In : Le Cirad au Brésil : rapport d'activités 2001-2002. Brasilia : CIRAD, p. 22-23.
- 2003 **Micheli F.** 2003. Bases genéticas da resistência do cacaueiro à doença de vassoura da bruxa (*Crinipellis perniciosa*) : [2001-02]. In : O Cirad no Brasil : relatório de atividades 2001-2002. Brasilia : CIRAD, p. 22-23.
- 2002 Alemanno L, Clément D, **Micheli F.**, Thévenin JM. Rapport de mission au Brésil du 15 au 31 octobre 2002. Montpellier : CIRAD-CP, 33-[7] p. CP-SIC 1557.

9. SYNTHÈSE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

9.1. INTRODUCTION³

Au cours de mon parcours scientifique, j'ai eu l'occasion de travailler successivement sur des thématiques différentes toutes liées au monde végétal. Les différents sujets que j'ai étudiés ont contribué à mon développement personnel et professionnel, et m'ont permis d'avoir accès à des connaissances, des techniques et à une expérience que je peux utiliser aujourd'hui dans mon activité professionnelle au Cirad.

Pendant ma thèse, je me suis intéressée au rôle des pectines méthylesterases (PMEs) dans la différenciation des dérivées cambiales chez le peuplier à partir d'approches enzymologiques et moléculaires (**Micheli et al., 2000** ; **Siedlecka et al., 2007**). Ce travail, mené dans le cadre d'une collaboration européenne, s'intégrait à une étude plus générale de la production du xylème (bois) et du phloème, dans un but d'utilisation ultérieure dans différentes stratégies d'amélioration du bois. Les PME sont des enzymes pariétales qui catalysent *in muro* la déméthylestérification des pectines selon deux modes d'action régulés par différents facteurs (e.g. pH, concentration ionique) (Pressey, 1984 ; **Micheli, 2001**). Chez les végétaux supérieurs, les PME existent sous de nombreuses isoformes possédant des caractéristiques biochimiques variées (Bordenave et Goldberg, 1993). Ces isoformes sont codées par une famille de gènes, dont certains sont exprimés de façon constitutive alors que d'autres ont une régulation plus spécifiquement liée au développement d'un organe (**Micheli et al., 1998**). Ces données suggèrent que les PME participent à des mécanismes de croissance et de différenciation cellulaires très variés. Les PME sont également des enzymes produites par différents microorganismes (bactéries et champignons) qui les utilisent pour envahir leur hôte et dégrader les tissus végétaux (Herron et al., 2000).

Au cours de recherches post-doctorales, je me suis intéressée à la symbiose fixatrice d'azote *Rhizobium*-Légumineuses, ou nodulation (Albrecht et al., 1999 ; Schultze and Kondorosi, 1998), qui en plus de son importance agronomique, représente un modèle expérimental de choix pour étudier des problématiques d'un grand intérêt en biologie du développement : perception-transduction de signaux (tels que les facteurs Nod, signaux symbiotiques clefs de nature lipo-chito-oligosaccharidique), processus morpho- et organogénétiques (en particulier production des nodosités racinaires, organes spécifiques de cette symbiose), perception différentielle par la plante des micro-organismes pathogènes et symbiotiques. L'utilisation d'approches de génomique ont permis d'identifier la présence de séquences non homologues à celles déjà présentes dans les bases de données nucléotidiques, et qui représentent donc de nouveaux gènes impliqués dans la nodulation, en particulier des facteurs de transcription. Une étude d'expression par qRT-PCR

effectuée au cours des étapes de la nodulation montre que des gènes codant pour des facteurs de transcription bHLH, WRKY et C2H2 zinc-finger protein sont superexprimés en réponse à l'inoculation para *S. meliloti* (Journet et al., 2002 ; Godiard et al., 2007).

Depuis 2002, dans le cadre de la collaboration Cirad-Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC, Ilhéus, Bahia, Brésil), mon travail s'est orienté vers l'étude de l'interaction *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipellis perniciosa*). *Moniliophthora perniciosa* est un champignon hémibiotrophe responsable de la maladie du balai de sorcière, une des maladies qui affecte le plus fortement la production de cacao, avec des conséquences économiques et sociales importantes pour la population locale, particulièrement dans la région de Bahia au Brésil. L'objectif du travail entrepris consiste à décrypter, à la fois les mécanismes d'infection du champignon et les mécanismes de résistance de la plante dans le but de développer à court et moyen termes des stratégies de contrôle de la maladie. Pour cela, dans le cadre de la collaboration franco-brésilienne Cirad-UESC, nous avons opté pour l'analyse des mécanismes d'interaction cacaoyer-*M. perniciosa* par des approches de génomique fonctionnelle et de protéomique. L'UESC et le Cirad, en collaboration avec la Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) participent également au développement de marqueurs moléculaires non neutres (à partir de séquences codantes) comme base pour de la cartographie fine, et à plus long terme, pour le *pyramiding* de gènes et la sélection assistée par marqueurs (SAM) de clones de cacaoyers résistants au balai de sorcière.

Quels points communs entre ces différents sujets ? Bien que paraissant à priori éloignées, ces différentes expériences professionnelles ce recoupent au niveau : i) de sujets impliquant des ligneux (peuplier, cacaoyer) ; ii) de sujets impliquant des interactions plante-microorganismes (*Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti*, *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*) ; iii) des techniques utilisées (biologie moléculaire, enzymologie, génomique) et iv) du développement d'outils méthodologiques (e.g. analyse enzymatique de PME à partir de petites quantités de matériel, protocole d'extraction d'ARN de cacaoyer). De plus, ces études, bien qu'impliquant des plantes d'intérêt agronomique, s'inscrivent dans une recherche fondamentale, basée sur le développement de connaissances plus que sur le développement de produits agronomiques ou d'outils d'aide à la sélection. Finalement, ces travaux ont un fort ancrage dans le milieu universitaire puisque dix de mes années de recherche ont été effectuées sur deux sites, l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6, France) et l'UESC. Mon insertion dans le système universitaire m'a conduit à rapidement m'impliquer dans l'encadrement d'étudiants, en particulier de master et de doctorat, et m'engager administrativement dans la gestion d'une école doctorale brésilienne (*Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular*).

³ Les références en gras correspondent aux articles dont je suis co-auteur

Du fait de la diversité de mon parcours, j'ai décidé de présenter dans ce mémoire exclusivement mes travaux les plus récents qui portent sur l'étude de l'interaction *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa*, mais sans oublier que leur réalisation doit beaucoup à mes expériences antérieures. Une partie sera également consacrée au détail de mon implication dans la vie académique brésilienne, du montage de projet aux responsabilités administratives en passant par l'encadrement d'étudiants. Enfin, je présenterai mon projet professionnel pour les 4 prochaines années, en tenant compte que celles-ci complèteront dix années d'expatriation dans le cadre de la collaboration Cirad-UESC.

9.2. ETUDE DE L'INTERACTION THEOBROMA CACAO-MONILIOPHTHORA PERNICIOSA

9.2.1. Le cacaoyer

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est un arbre à feuilles persistantes de l'ordre des Malvales qui appartenait à la famille des Sterculiacées (Cuatrecasas, 1964) et a été reclassé récemment dans la famille des Malvacées (Alverson et al., 1999). Le genre *Theobroma* inclut 22 espèces dont seuls le cacaoyer et le cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) sont des espèces dont le produit est commercialisé (Cuatrecasas, 1964). L'espèce *Theobroma cacao* est préférentiellement allogame, diploïde ($2n = 2x = 20$) et possédant un génome estimé à 0,43 pg ou $0,415 \times 10^9$ pb (Figueira et al., 1992). Le cacaoyer une plante de climat tropical native de la forêt humide amazonienne. Son probable centre d'origine se trouve aux confins du bassin de l'Amazone, au pied des Andes, à la frontière de l'Equateur avec la Colombie (Cheesman, 1944). A partir de son centre d'origine, le cacaoyer s'est dispersé en deux groupes distincts : les Criollo cultivés à l'ouest de la Cordillère des Andes, dans une zone allant du nord de l'Amérique du sud jusqu'au Mexique ; et les Forastero cultivés à l'est de la Cordillère des Andes, dans la région comprenant le nord du Brésil et allant jusqu'aux Guyanes (Cuatrecasas, 1964). Un troisième groupe, les Trinitario, a surgit, à Trinidad, de l'hybridation naturelle des deux premiers groupes (Cheesman, 1944). Récemment, cette classification fondée sur les caractéristiques morphologiques et sur l'origine géographique du cacaoyer a été revue. L'utilisation de 106 marqueurs microsatellites sur 1241 accessions de cacaoyers couvrant un large échantillonnage géographique a permis une classification en 10 groupes (Marañon, Curaray, Criollo, Iquitos, Nanay, Contamana, Amelonado, Purús, Nacional et Guiana) reflétant plus précisément la diversité génétique du cacaoyer (Motamayor et al., 2008).

Le cacaoyer produit des fruits, appelés cabosses, portés par le tronc et les plus grosses branches (Fig. 1A). Les cabosses comportent en moyenne de 20 à 40 fèves (entourées de pulpe mucilagineuse) qui après fermentation, séchage et torréfaction sont utilisées pour la fabrication du chocolat et d'autres produits dérivés (Fig. 1H à N). Les trois principaux groupes de variétés de cacaoyers se distinguent par la morphologie de leurs fruits. Les Criollo produisent de grandes

cabosses à l'écorce souvent rugueuse (Fig. 1F et G), aux fèves ayant des cotylédons blanc ou violet clair et qui sont utilisés pour l'obtention de chocolats aromatiques encore appelés chocolats fins (Cuatrecasas, 1964). Les Forastero produisent des cabosses qui présentent une grande variabilité de forme, de cortex, de nombre et de taille de fèves, lesquelles sont généralement violettes (Rosário et al., 1978 ; Fig. 1D). Dans ce groupe, considéré pour présenter la plus grande diversité génétique et une meilleure qualité agronomique que les Criollo, on trouve la variété *cacau comun*, de type Amelonado (cabosse de forme ovale présentant un cortex lisse) qui est à l'origine du premier verger de cacaoyers du sud de l'état de Bahia. Les cacaoyers de type Forastero Amelonado sont aussi ceux qui ont été utilisés pour constituer les premières plantations de cacaoyers en Afrique de l'Ouest. La variété Catongo, originaire de Uruçuca (Bahia, Brésil) est également un Forastero qui a la particularité d'avoir des fèves et de fleurs (staminodes) blanches, suite à une mutation liée à la pigmentation (Marita et al., 2001). Les Trinitario, hybrides entre Forastero et Criollo, forment un groupe de cacaoyers aux caractères intermédiaires dont les caractéristiques dépendent de la répartition et des effets des allèles des deux groupes fondateurs.

9.2.2. La cacaoculture brésilienne

Le cacaoyer est cultivé en Amérique du sud et en Amérique centrale, dans les Caraïbes, en Afrique et en Asie. Du point de vue économique, le cacao est considéré comme l'une des principales cultures tropicales à niveau mondial, avec en 2007, une production totale de 4 012 310 tonnes (FAO, 2009). En 2006 et 2007, la production du Brésil a été estimée à 212 270 et 221 699 tonnes, respectivement. Avec ces valeurs, le Brésil se place en cinquième position pour la production de fèves de cacao après la Côte d'Ivoire (1 300 000 tonnes en 2007), le Ghana (690 000 tonnes en 2007), l'Indonésie (620 000 tonnes en 2007) et le Nigéria (500 000 tonnes en 2007). En 2006, la production de fèves de cacao par le Brésil était évaluée à 2064,75 USD/tonne (FAO, 2009). En 2008, le cours du cacao bat des records et atteint les 2890 USD/tonne, représentant le plus haut prix de la fève de cacao en au moins 10 ans. En 2001, Dias estimait que la filière cacao au Brésil impliquait des investissements de l'ordre de deux milliards de réais dont 1,7 milliard dans le secteur primaire, et était responsable pour approximativement 300 000 emplois directs et 3 millions de personnes.

Au Brésil, dans l'état de Bahia, le cacaoyer a été introduit en 1746 à partir de fèves de Forastero ramenées de l'état du Pará (Vello and Garcia, 1971). Il est récolté deux fois par an, lors

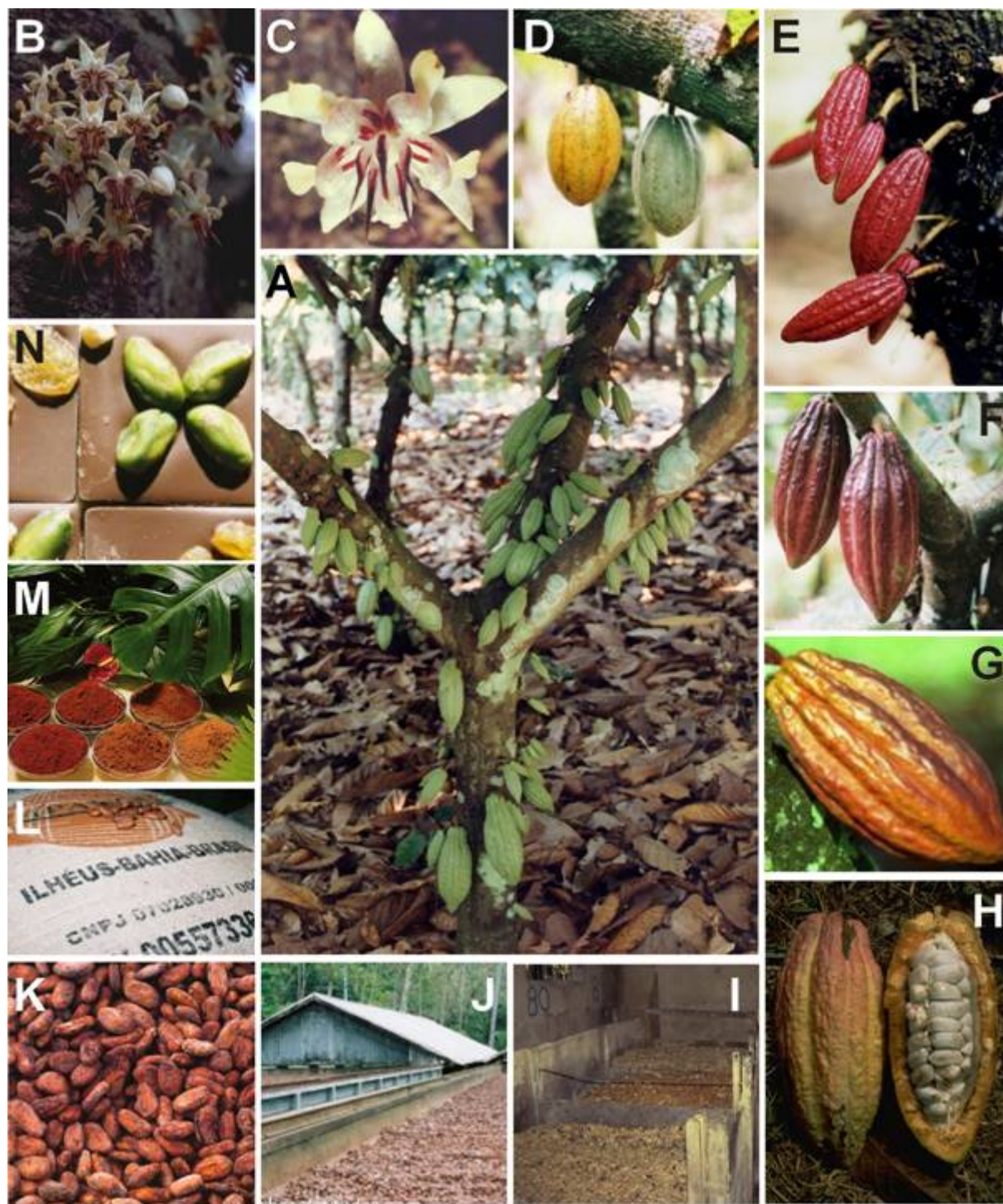


Figure 1. Du cacaoyer au chocolat. **A.** Cacaoyer chargé de cabosses. **B.** Coussinet floral. **C.** Fleur de cacaoyer. Taille réelle : 1 cm **D.** Cabosses de type Forastero. **E.** Cherelles. Taille réelle : 5 cm. **F et G.** Cabosses de type Criollo. **H.** Cabosse ouverte montrant les fèves entourées de pulpe. **I.** Caisses de fermentation. **J.** Séchoir pour les fèves (type *barcasse*). **K.** Fèves de cacao fermentées et séchées. **L.** Conditionnement des fèves en sac. **M.** Poudres de chocolat. **N.** Bouchées au chocolat. Crédits photos : A, C et K : Didier Clément©Cirad ; B et H : Claire Lanaud©Cirad ; D, F, G, J, L et N : chocolattitudes.com. ; E : Laurence Alemanno©Cirad ; I : Emile Cros©Cirad ; M : Barry Callebaut, D. R.

d'une récolte principale, de septembre à février (*principal*), et d'une récolte saisonnière (*temporão*), de mars à août. A la fin du XIX^{ème} siècle, l'état de Bahia était déjà un grand producteur mondial et le principal producteur national. A cette époque, le cacao représentait 40 à 50% de la totalité des exportations de l'état de Bahia (Pereira et al., 1989). La seconde moitié du XX^{ème} siècle a été marquée par une très forte augmentation de l'activité du sud de l'état de Bahia en fonction d'un scénario national et international favorable. Ainsi, les prix élevés atteints dans les années 1970 – avec des valeurs de 3633 USD/tonne en 1976/1977 – ont été à l'origine d'une considérable croissance de la recette des pays producteurs, Brésil inclus. A cette époque, la culture du cacao et particulièrement l'industrie de transformation du cacao sont devenus attractifs pour des investissements au travers de capitaux nationaux et internationaux. Du fait des hauts rendements obtenus, le gouvernement brésilien a favorisé l'augmentation de la production de cacao au travers de la concession de crédits et d'assistance technique. A cette époque, près de 90% de la production de cacao était destinés à l'exportation (Bastos, 2000). Les plantations de cacaoyer étaient alors cultivées sur 29.000 propriétés rurales d'une superficie totale supérieure à 700.000 ha et distribuées sur 106 municipalités (Souza and Dias, 2001). Mais à partir des années 1980, en raison de différents facteurs comme les chutes successives de production dues à des conditions climatiques irrégulières entre 1987 et 1993, auxquelles s'ajoutent la superproduction mondiale et la réduction des prix des produits sur le marché international, la cacaoculture brésilienne se retrouve dans une situation de crise. Cette crise est aggravée en 1989 par l'apparition dans l'état de Bahia de la maladie du balai de sorcière due au champignon *Moniliophthora perniciosa* qui dévasta les plantations avec d'autant plus de facilité que les producteurs avaient investi quasi exclusivement dans la production de cacao, sans aucune diversification de leur culture ni des génotypes utilisés. Selon les données de la CEPLAC, la production brésilienne de cacao a enregistré une réduction de volume de production de 72% entre les années 1990 (356.327 tonnes, récolte 1990/1991) et 1999 (98.617 tonnes, récolte 1999/2000) (Hartmann and Sanches, 2005). En 2002, alors que la production nationale de cacao présentait une décroissance de 6,06%, la décroissance de la production dans l'état de Bahia était de 12,92% (Lauria et al., 2002). Bien qu'ayant dépassé la phase la plus aiguë de la crise à la fin du siècle dernier, et malgré la hausse récente du cours du cacao, le producteur brésilien de cacao est encore soumis à de graves difficultés. Le revenu du producteur bahianais, directement lié à la baisse de production, a chuté de 35% entre les récoltes 2002/2003 et 2005/2006. Cette réalité est encore aggravée par l'augmentation des coûts de production sur la même période et par l'endettement des producteurs durant la période faste de production du cacao (Hartmann and Sanches, 2005). Dans ces conditions, le producteur réussit difficilement à couvrir les frais de manutention de sa plantation, et n'a pas les conditions nécessaires pour subvenir aux besoins de sa famille. En plus de la réduction significative de la

production et des revenus des producteurs, on observe d'autres impacts de la crise : réduction d'emploi aussi bien dans le milieu agricole que dans l'industrie ou dans le commerce régional (300.000 personnes sans emploi) ; augmentation du nombre d'entreprises faisant faillite ; migrations internes ; développement des bidonvilles autour des centres urbains de la région ; augmentation générale de la pauvreté dans l'état de Bahia ; et accentuation des agressions à la Forêt Atlantique (Trevizan and Silva Jr, 1995). En effet, les plantations de cacaoyers poussent dans un système appelé *Cabruca*, c'est-à-dire sous couvert des restes de la Forêt Atlantique, permettant la conservation de celle-ci (Araujo, 1997; Almeida, 2001). Suite à la crise, la substitution des plantations de cacaoyers par d'autres cultures a donc causé un impact négatif sur le maintien de la Forêt Atlantique, considérée comme un des *hot spots* de diversité de la planète. Il faut noter également qu'afin d'augmenter les revenus de la famille, les producteurs ont été amenés à développer des pratiques illégales et à fort impact sur la biodiversité comme la coupe et la vente de bois (Alger and Caldas, 1993).

9.2.3. La maladie du balai de sorcière

Parmi les principales maladies qui affectent la cacaoculture, la maladie du balai de sorcière est une des plus importantes et des plus dévastatrices, et peut causer jusqu'à 100% de dommages selon les plantations (Pereira et al., 1989). Originnaire du bassin amazonien, elle a été décrite pour la première fois en 1875 au Suriname (Holliday, 1952). Aujourd'hui, on la trouve dans tous les pays d'Amérique latine et dans les Caraïbes. En 1989, elle a été introduite dans le sud de l'état de Bahia, simultanément dans deux municipalités (Camacam et Uruçuca), et probablement par intervention humaine (Pereira et al., 1989 ; Rocha et al., 1993; Andebrhan et al., 1999). A partir de ces deux centres, la maladie s'est propagée dans toute la région cacaoyère où elle a trouvé des conditions propices à son développement, se transformant en une épidémie fatale pour la région.

La maladie du balai de sorcière est causée par le champignon hémibiotrophe *Moniliophthora perniciosa* (= *Crinipellis perniciosa*) (Stahel) Singer (Aime and Phillips-Mora, 2005) appartenant à l'ordre des Agaricales, famille Tricholomataceae, classe des basidiomycètes. Quatre biotypes de *M. perniciosa* ont été identifiés en fonction de leur hôte : les biotypes C, B, L et S affectent la famille des Sterculiacées (dont le cacaoyer et le cupuaçu), *Bixa orellana*, les lianes (*Bignoniaceae*) et la famille des Solanacées, respectivement (Griffith and Hedger, 1994). Il est intéressant de noter qu'aucun mécanisme de reproduction asexuée n'est connu chez *M. perniciosa*. Les basidiospores sont les uniques formes infectieuses du champignon ; elles infectent les tissus méristématiques de différents organes de la plante (rameaux, coussinets floraux, fleurs simples, fruits) causant une gamme de symptômes qui dépend de l'organe infecté et de son stade de développement (Silva et al., 2002 ; Fig. 2). La croissance hypertrophique des méristèmes végétatifs

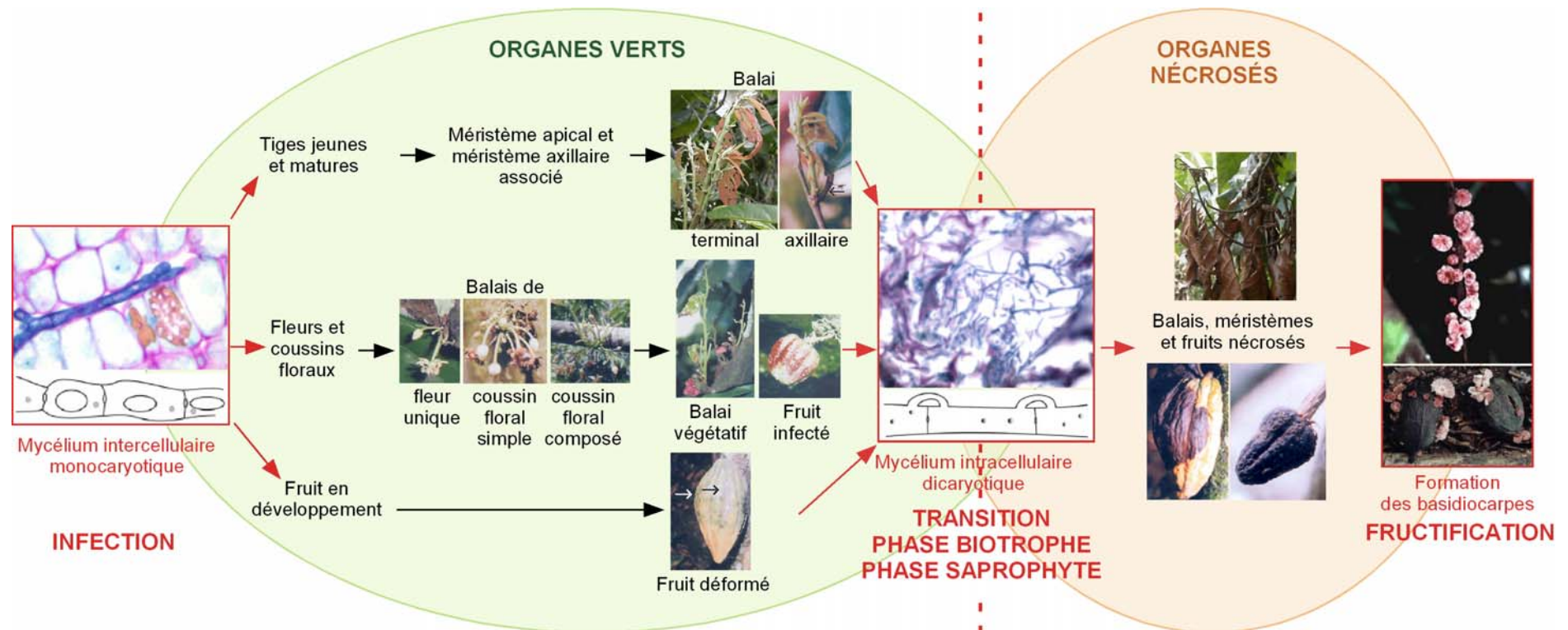


Figure 2. Symptômes de la maladie du balai de sorcière en relation avec le développement de *Moniliophthora perniciosa*. En vert et marron: phase biotrophe et saprophyte du champignon, respectivement. En rouge: données relatives au champignon; en noir: données relatives à la plante. Tiré de Lopes (2005), selon Silva et al. (2002), Scarpari et al. (2004) et Ceita et al. (2007).

infectés, qui aboutit à la formation d'une structure en forme de balai (d'où le nom de la maladie), est le symptôme le plus caractéristique. L'infection des fleurs et coussinets floraux est suivie du passage de la structure florale en structure végétative, elle-même amenée à se transformer en balai. Enfin, l'infection des fruits se fait quand ceux-ci sont encore en développement (cherelles) ou déjà au stade mature. Quel que soit l'organe infecté, la phase finale de la maladie consiste en la nécrose de l'organe. L'hypertrophie des organes de la plante correspond à la phase biotrophe/parasitique du champignon, alors que la phase de nécrose des organes végétaux correspond à la phase nécrotrophique /saprophyte du pathogène (Fig. 2).

Les basidiocarpes sont émis par le champignon à partir des organes nécrosés et en fonction des conditions environnementales : humidité relative $\geq 80\%$, fortes précipitations (1000 à 2000 mm) et à une température comprise entre 22 et 28°C (Purdy and Schmidt, 1996). À partir des basidiocarpes, sont émises les basidiospores capables d'initier de nouvelles infections (Fig. 3). Dans le cas de l'interaction sensible, et considérant l'infection du méristème végétatif, les spores monocaryotiques de *M. perniciosus* pénètrent dans les feuilles et les tiges au niveau des stomates ou de blessures, et envahissent les tissus encadrant les méristèmes apicaux où les principaux symptômes (micro- et macroscopiques) de la maladie apparaissent (Sreenivasan and Dabydeen, 1989 ; **Ceita et al., 2007** ; Fig. 3). Au niveau cellulaire, le mycélium se développe de la base de la tige vers le méristème apical, et des tissus externes (épiderme et cortex) vers les tissus internes (vaisseaux conducteurs de sève) (Kilaru and Hasenstein, 2005 ; **Ceita et al., 2007** ; Fig. 4). Durant la phase de colonisation, le mycélium (5 à 20 μm) croît entre les cellules (mycélium monocaryotique et intracellulaire), et compte tenu de l'absence d'appressorium, il est probable que le champignon subsiste grâce aux nutriments présents dans l'apoplasme (Meinhardt et al., 2006 ; **Ceita et al., 2007**). De 50 à 90 jours après infection, les hyphes produisent des anses d'anastomoses (*clamp connections* ; Fig. 4R), et deviennent dicaryotiques et intracellulaires (phase saprophyte ; épaisseur de l'hyphe 1 à 3 μm). La transition de phase est graduelle, et il est possible d'observer dans un même tissu végétal, la présence d'hyphes inter- et intracellulaires (**Ceita et al., 2007** ; Fig. 4Q). Les mécanismes impliqués dans le changement de phase du champignon (de biotrophe à saprophyte) ne sont pas connus, mais ils coïncident avec la fin du développement du balai vert (*green broom*) et la sénescence de celui-ci (formation du balai sec = *dry broom*) (Calle et al., 1982). Un aspect important de la maladie est que le processus infectieux, le développement de la maladie et la mort des tissus ont lieu

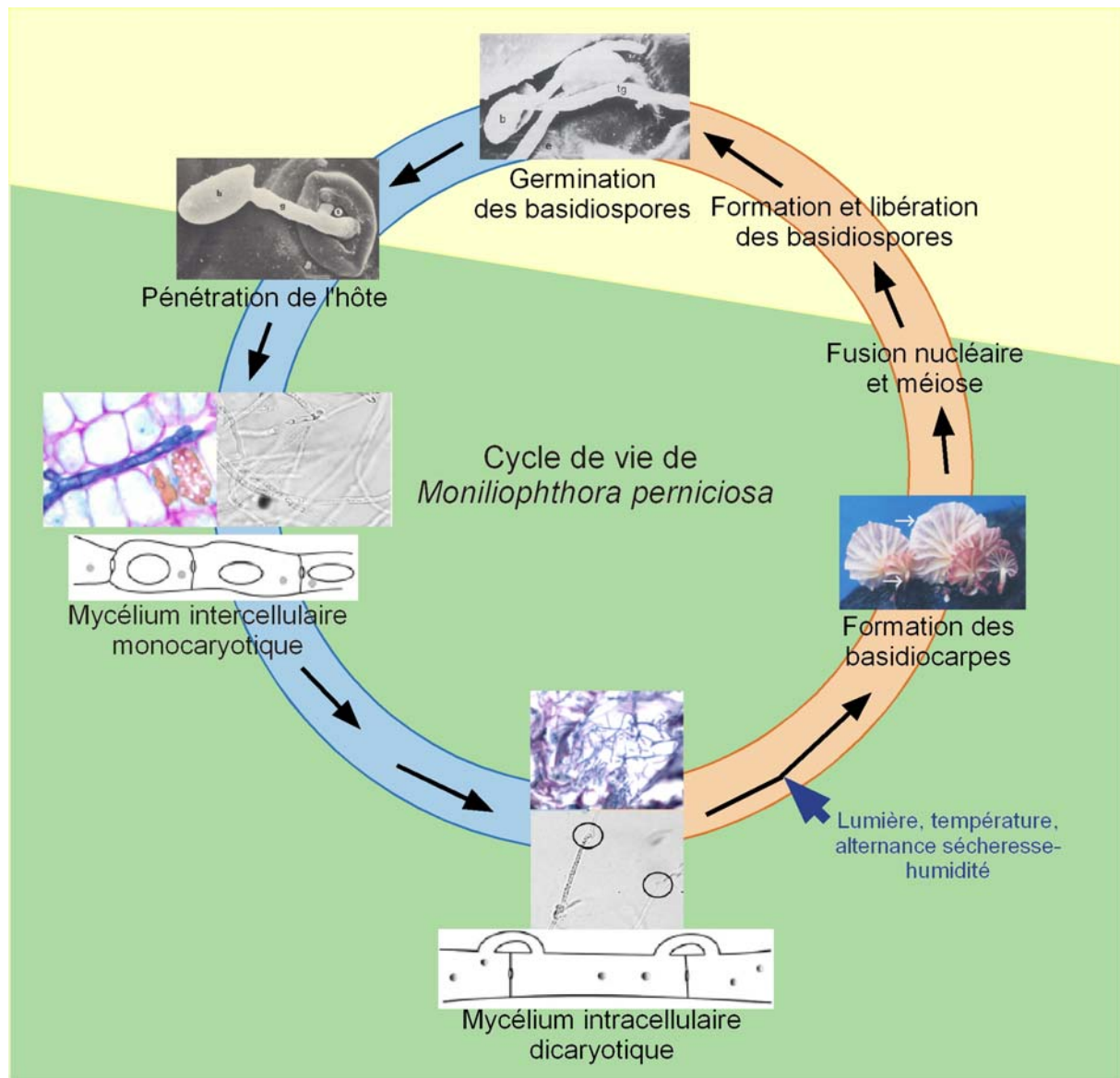


Figure 3. Cycle de vie du basidiomycète hemibiotrophe *Moniliophthora perniciosa*. Les parties du cycle en bleu et orange correspondent, respectivement, aux phases biotrophe et saprophyte du champignon durant son interaction avec le cacaoyer. En vert : partie du cycle correspondant à l'interaction avec le cacaoyer. En jaune : partie du cycle ayant lieu hors de l'hôte. Tiré de Lopes (2005), selon Silva et al. (2002), Scarpari et al. (2004), Ceita et al. (2007), Sreenivasan and Dabydeen (1989), et Silva and Matsuoka (1999).

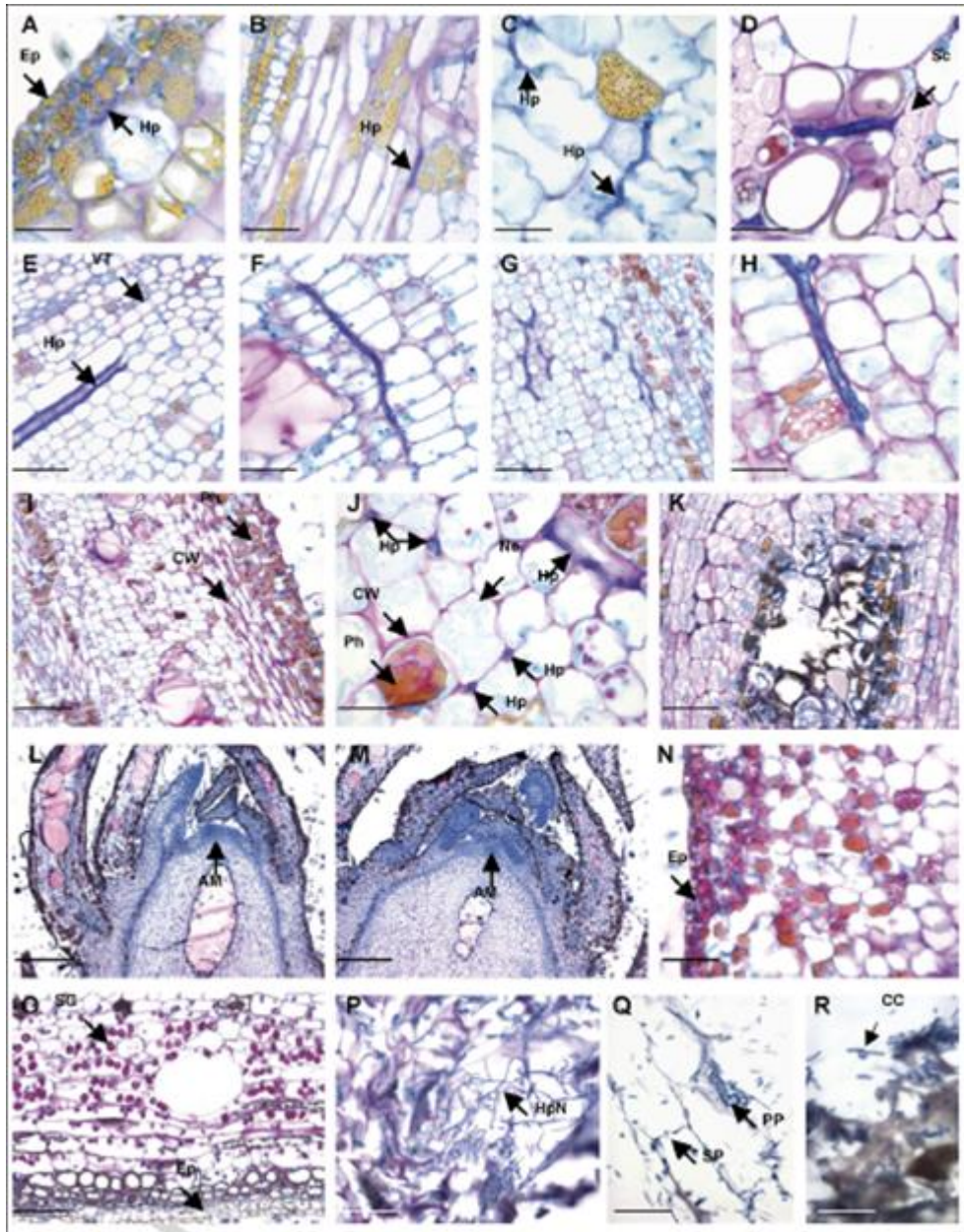


Figure 4. Pénétration et progression du mycélium de *M. perniciosa* dans les méristèmes et les tiges de cacaoyers sensibles (Catongo). **A.** Premières hyphes observées sous l'épiderme de la tige, 2 jours après inoculation (JAI) (barre = 30 μ m). **B.** Pénétration du champignon dans le cortex de la tige, 13 JAI (barre = 60 μ m). **C.** Progression intercellulaire du champignon (barre = 30 μ m). **D.** Champignon près des cellules du sclérenchyme, 36 JAI (barre = 30 μ m). **E.** Progression du champignon dans les tissus vasculaires, 36 JAI (barre = 60 μ m). **F.** Mycélium entre les cellules médullaires en section longitudinale, 36 JAI (barre = 30 μ m). **G.** Colonisation des cellules médullaires par le champignon, 50 JAI (barre = 60 μ m). **H.** Augmentation du diamètre des hyphes, 50 JAI (barre = 30 μ m). **I.** Signes de différenciation au niveau de la tige, 50 JAI (barre = 120 μ m). **J.** Coupe transversale de la tige montrant des composés phénoliques et des signes de nécrose, 50 JAI (barre = 30 μ m). **K.** Nécrose à l'intérieur de la moelle, 50 JAI (barre = 60 μ m). **L.** Coupe longitudinale d'un méristème contrôle (non infecté), 57 JAI (barre = 240 μ m). **M.** Coupe longitudinale d'un méristème infecté, 57 JAI (barre = 240 μ m). **N.** Absence de grains d'amidon dans le cortex des plantes non infectées, 65 JAI (barre = 60 μ m). **O.** Présence de grains d'amidon dans le cortex des plantes contrôle, 65 JAI (barre = 60 μ m). **P.** Nécrose et prolifération du champignon, 90 JAI (barre = 30 μ m). **Q.** Présence simultanée d'hyphes inter- et intracellulaires, 90 JAI (barre = 30 μ m). **R.** Anse d'anastomose, 90 JAI (barre = 30 μ m). AM: Méristème apical; CC: anse d'anastomose; CW: paroi cellulaire; Ep: épiderme; Hp: hyphe biotrophe; HpN: hyphe nécrotrophe; Ne: nécrose; Sc: sclérenchyme; SG: grain d'amidon; SP: phase saprophyte; Ph: composés phénoliques; PP: phase parasitique; VT: tissus vasculaires. D'après Ceita et al. (2007).

au point d'infection mais également dans les tissus en croissance éloignés du point d'infection (Silva et al., 2002 ; **Ceita et al., 2007**). De plus, il est intéressant de noter que le balai vert contient une biomasse fongique limitée, alors que les tissus nécrosés (balai sec) sont très rapidement colonisés par le champignon.

Les méthodes de contrôle de la maladie du balai de sorcière incluent l'élagage, le traitement chimique, le contrôle biologique et la sélection de plantes résistantes (Meinhardt et al., 2008). L'élagage, qui consiste au retrait et à la destruction des parties infectées de la plante, résulte en une diminution des fruits atteints par la maladie. Toutefois, cette stratégie est fastidieuse et coûteuse, et selon l'étude de Rudgard et Butler (1987), il est nécessaire de retirer 95% des parties infectées pour obtenir seulement 50% de réduction de la quantité de fruits malades. Le traitement chimique des plantations de cacaoyers avec des fongicides est extrêmement coûteux et comporte des risques associés à la contamination des fèves et de l'environnement ; pour ces raisons, il est peu utilisé (Meinhardt et al., 2008). Il faut également noter que l'intérêt croissant des pays producteurs et consommateurs de chocolat pour des produits issus de l'agriculture biologique n'encourage pas les producteurs à utiliser ce genre de pratiques culturales. Le contrôle biologique de la maladie du balai de sorcière peut être également lié à la présence d'endophytes du cacaoyer capables de restreindre le développement de *M. perniciosa*. Parmi ces endophytes, on trouve *Trichoderma stromaticum* (Chet et al., 1998 ; Howell et al., 2003), champignon qui parasite le mycélium saprophyte et les basidiocarpes de *M. perniciosa* (Samuels et al., 2000). Des préparations commerciales à base de *T. stromaticum* ont été développées au Brésil (Trichovab®, CEPLAC-BA), et bien que prometteuses, elles n'ont pas eu l'impact espéré pour un contrôle efficace de la maladie. L'application de tels produits (tout comme l'application de fongicides) n'est pas forcément aisée vu que le cacaoyer est cultivé sous couvert de la Forêt Atlantique et dans des conditions climatiques peu favorables (e.g. forte pluviosité responsable pour le lessivage des produits appliqués). Considérant la résistance génétique, dans les collections actuelles, il existe plusieurs génotypes de cacaoyers (sauvages ou sélectionnés) résistants au balai de sorcière (Marita et al., 2001 ; Meinhardt et al., 2008). Les génotypes Scavina6 et 12 (SCA6 et SCA12) ont été les premiers génotypes hautement résistants au balai de sorcière utilisés dans les programmes d'amélioration (Bartley, 1986 ; Pound, 1943). Au moins 300 variétés ont été ensuite obtenues à partir de géniteurs SCA, parmi lesquelles la série de clones TSH (*Trinidad Selected Hybrids*) sélectionnée par le programme d'amélioration de Trinidad à partir de SCA6 (Albuquerque, 2006). Ces clones ont été utilisés commercialement à Trinidad et sont également utilisés dans les programmes d'amélioration brésiliens (e.g. TSH1188), et ont

contribué pendant de nombreuses années à la réduction de l'attaque de *M. pernicioso*. Toutefois, dans des pays comme l'Equateur, la Colombie et le Pérou, où *M. pernicioso* est plus agressif, les clones de la série SCA et leurs descendants ont eu leur résistance rapidement contournée par le champignon, probablement du fait de la grande variabilité de celui-ci dans ces régions (Bartley, 1986 ; Rios-Ruiz, 2001). Au Brésil, en Amazonie, des clones de la série SCA ont été également utilisés comme principale source de résistance à *M. pernicioso* dans les programmes d'amélioration de la CEPLAC, initiés en 1976. Comme il avait été vérifié dans les autres pays, quelques années après l'introduction de ces génotypes, il a pu être constaté de hauts niveaux d'incidence de la maladie, aussi bien dans les jardins de production de graines hybrides que dans leurs descendance utilisées pour les croisements et pour la production de plants commerciaux (Bartley, 1986). Dans le sud de l'état de Bahia, un programme de rénovation des cacaoyers a été implanté, après l'introduction de la maladie du balai de sorcière, afin de remplacer les variétés sensibles, estimées à près de 60% des plants existants dans la région, par des variétés plus productives et résistantes à *M. pernicioso*. Un des grands défis des améliorateurs est donc d'élargir la base génétique des variétés distribuées aux producteurs considérée aujourd'hui comme étroite et de veiller à sélectionner des résistances durables (Yamada and Lopes, 1999 ; Yamada et al., 2001 ; Santos et al., 2005). L'obtention de nouvelles sources de résistance à *M. pernicioso* est aujourd'hui considérée comme une priorité des programmes d'amélioration du cacaoyer. Parmi les germoplasmes existants, en particulier celui de la CEPLAC-PA, d'autres génotypes comme les génotypes CAB (*Cacau da Amazônia Brasileira*), génétiquement distincts des sources traditionnelles de résistance SCA6 et SCA12 (Silva et al., 1998 ; Mota, 2003) ont été sélectionnés.

La lutte contre la maladie du balai de sorcière passe donc par l'amélioration du cacaoyer par des programme de sélection utilisant les méthodes d'analyse de la génétique quantitative, ainsi que par le développement d'outils moléculaires d'aide à la sélection (marqueurs neutres et gènes candidats) fournissant les connaissances indispensables sur les bases génétiques et fonctionnelles de la résistance du cacaoyer à cette maladie. Comme dans toute maladie liée à un agent infectieux, n'observer que le « patient » sans s'intéresser à la biologie de l'agent pathogène serait vain. La lutte contre cette maladie doit aussi explorer chez le champignon les facteurs trophiques et génétiques conduisant aux changements de phases au cours de son cycle de vie, permettant d'envisager un contrôle ciblé du développement du champignon.

9.2.4. Culture de *M. perniciosa* en milieux artificiels

Un des défis de l'étude du pathogène est la possibilité de cultiver celui-ci hors de son hôte, tout en se situant dans des conditions les plus proches possibles des conditions naturelles. Dans le cas de *M. perniciosa*, plusieurs types de cultures en milieux artificiels ont été établis et consistent : i) en la culture du mycélium saprophyte (en milieu synthétique liquide ou solide sur galette) ; ii) en la culture du mycélium biotrophe ; et iii) en la culture de pseudo-colonies de *M. perniciosa* (à partir de mycélium biotrophe ou saprophyte) utilisées pour des tests de toxicité.

Il est possible de cultiver le mycélium saprophyte de *M. perniciosa* en milieu liquide ou solide. Plusieurs milieux sont utilisés : i) milieu contenant glucose, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, extrait de levure, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ et $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Lopes et al., 2008); ii) milieu CPD contenant glucose 2% et peptone 2% (avec ou sans agar; Meinhardt et al., 2006 ; Filho et al., 2006); iii) milieu PDA (*potato-dextrose agar*).

La culture de *M. perniciosa* sur galette est l'unique qui permette l'obtention de basidiocarpes (et donc de basidiospores) *in vitro* (Niella et al., 1999 ; Fig. 5). Cette méthode est donc essentielle pour : i) l'obtention de spores pour effectuer des tests de germination, infection, etc. ; et ii) pour l'étude des différentes phases de développement du champignon, en particulier, celle de la formation du basidiocarpe. La galette est constituée de vermiculite (38,6%), plâtre (11,6%), son de blé (48,4%), sulfate de calcium (1,4%) et d'eau (en quantité suffisante pour saturer la galette ; Fig. 5A). Le mycélium cultivé en milieu solide (comme décrit précédemment) est appliqué sur les galettes et cultivé à 21-25°C, 100% d'humidité et photopériode de 12 h jusqu'à ce que le mycélium ait recouvert tout le substrat (environ 15 jours). Les galettes sont ensuite recouvertes avec de la terre provenant des cacaoyères autoclavée (*terriço de cacau*) et incubées de nouveau jusqu'à ce que le mycélium ait recouvert toute la galette (environ 15 jours). A ce stade, les galettes sont suspendues dans un système clos (*vassoureiro* ; Fig. 5B) et maintenues dans les mêmes conditions de température, hygrométrie et photopériode que précédemment. Six différentes phases de développement du champignon sont observées lors de sa culture sur galette (Fig. 5C à I); les quatre premières doivent leur nom à la couleur du mycélium, les deux autres correspondent à la formation du corps de fructification. Celle-ci n'est obtenue qu'après application d'un « stress hydrique », i.e. une période pendant laquelle les galettes ne seront pas humidifiées. Les six phases sont : i) phase blanche qui correspond à la phase initiale de la culture du champignon (≈ 35 jours) ; ii) phase jaune (≈ 37 jours) ; iii) phase rose (≈ 40 jours) ; iv) phase rose foncée, apparaissant

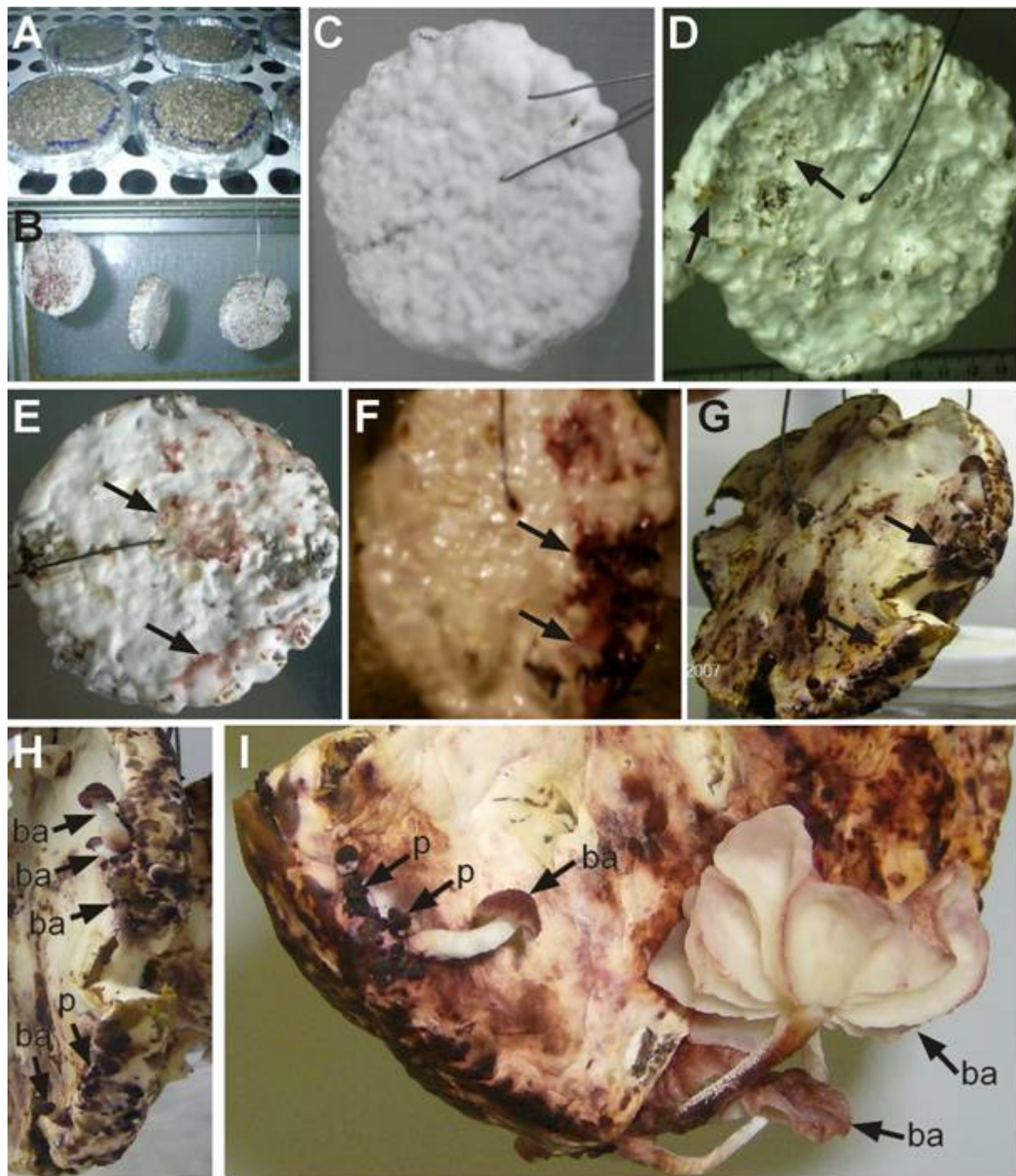


Figure 5. Culture de *M. perniciosus* sur galette. **A.** Préparation des galettes. **B.** Galettes accrochées dans un *vassoueiro* de petite taille. **C.** Phase blanche. **D.** Phase jaune. **E.** Phase rose. **F.** Phase rose foncée. **G.** Phase d'apparition des primordia. **H.** Primodium (p) et basiocarpes (ba) à différentes étapes de formation. **I.** Primordia (p) et basidiocarpes (ba). D'après Lopes (2005) et Gomes (2009).

après le « stress hydrique » (≈ 45 jours) ; v) primordium (≈ 60 jours) ; vi) basidiocarpe (≈ 75 jours).

La culture du mycélium biotrophe ainsi que les conditions permettant la transition de phase *in vitro* du champignon ont été récemment obtenues sur la base d'observations biochimiques des balais vert ou secs. En effet, de grandes quantités de glycérol ont été observées *in vivo* dans le balai vert lors de l'interaction cacaoyer-*M. pernicioso* (Meinhardt et al., 2006). Ainsi, le mycélium biotrophe issu des basidiospores est cultivé sur milieu LMCpS+ (agar 30 g/l, glycérol 20 ml/l, caféine 5 mg/l, acide indole-3-acétique 10 mg/l) et maintenu en culture en présence de glycérol. Le transfert du mycélium sur un milieu contenant une autre source de carbone que le glycérol (e.g. éthanol, fructose, glucose, sorbitol ou saccharose 2%) amène à la transition du mycélium de biotrophe à saprophyte. La présence de cristaux d'oxalate de calcium a été détectée dans les cultures de mycélium biotrophe et saprophyte de *M. pernicioso* (del Rio et al., 2007). L'acide oxalique est connu pour être un facteur de virulence chez certains champignons pathogènes ; en éliminant le calcium des pectines, il favorise l'accessibilité de cette dernière à des enzymes pectinolytiques (e.g. pectine méthylesterases, polygalacturonases) et en conséquence la dégradation de la paroi végétale (del Rio et al., 2007 ; Rincones et al., 2008).

A partir du mycélium (biotrophe ou saprophyte), il est possible d'obtenir des pseudo-colonies pouvant être utilisées dans des études de toxicité à des composés chimiques, mutagènes, UV, protéines, etc. (Filho et al., 2006). Le mycélium est cultivé sur milieu solide, puis transféré en milieu liquide contenant des billes de verre qui ont pour objectif de casser le mycélium en petits fragments (Fig. 6A). Ces fragments génèrent des pseudo-colonies qui se comportent comme des cellules uniques et peuvent être utilisées dans des études de toxicité sur *M. pernicioso* comme il est possible de le faire à partir d'organismes unicellulaire (e.g. *Saccharomyces cerevisiae*) (Fig. 6B).

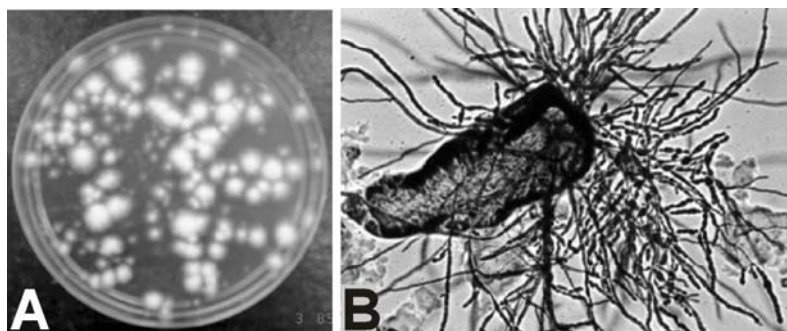


Figure 6. Pseudo-colonies de *M. pernicioso*. **A.** Visualisation de pseudo-colonies de *M. pernicioso* sur milieu solide après 7 jours de culture à 25°C. **B.** Observation microscopique d'une pseudo-colonie (ou *quasi-single cell*) de *M. pernicioso* après 5 jours de culture à 25°C (10X). D'après Filho et al. (2006).

9.2.5. Etudes moléculaires et fonctionnelles de *M. pernicioso*

Du fait de l'importance économique de la maladie du balai de sorcière et du peu de connaissances moléculaires du pathogène, un projet de séquençage du génome de *M. pernicioso* (Witches' broom Genome Project ; www.lge.ibi.unicamp.br/vassoura) impliquant plusieurs institutions et laboratoires brésiliens (dont l'UESC et la CEPLAC) a été initié en 2000 et récemment publié (Mondego et al., 2008). *M. pernicioso* a un génome de 28 Mb organisé en 8 chromosomes et contenant approximativement 8000 gènes. Cette analyse donne une vision générale du génome de *M. pernicioso* et met en lumière une proportion significative de gènes impliqués dans l'adaptation au stress et dans l'induction de la nécrose chez la plante, deux des étapes nécessaires au cycle de vie d'un champignon hemibiotrophe (Mondego et al., 2008). Cette analyse révèle également des traits adaptatifs de *M. pernicioso* qui pourraient jouer un rôle majeur dans les mécanismes de pathogénicité. Cette étude est complémentaire de données génomiques de *M. pernicioso*, précédemment obtenues : i) analyse du caryotype de *M. pernicioso* (Rincones et al., 2003) ; ii) analyse de la variation génétique et chromosomale de 38 isolats de *M. pernicioso* (biotypes C, S et L) collectés dans différentes régions du Brésil et de l'Equateur (Rincones et al., 2006) ; et iii) séquençage du génome mitochondrial de *M. pernicioso* (Formighieri et al., 2008). En parallèle, une étude de génomique et transcriptomique comparatives entre les phases biotrophe et saprophyte de *M. pernicioso* a été effectuée (Rincones et al., 2008). Des gènes spécifiques de chacune des phases ont été identifiés (e.g. oxaloacetate acetylhydrolase dans la phase biotrophe), ainsi que des gènes de virulence potentiels (e.g. glucuronyl hydrolase, putative chitinase) et des transposons (gènes induits dans la phase biotrophe). Ces derniers résultats suggèrent que l'activation de différents types d'éléments transposables peuvent être régulés durant le cycle de vie du champignon (Rincones et al., 2008).

A partir de ces données, qui permettent une meilleure connaissance moléculaire du pathogène et ouvrent des perspectives d'étude au niveau génétique, moléculaire et biotechnologique, des gènes ont été choisis pour de plus amples études fonctionnelles. C'est le cas de deux gènes codant pour des *necrosis and ethylene-inducing proteins* (*MpNEP1* et *MpNEP2*) détectés dans le génome de *M. pernicioso* ainsi que, pour l'un d'entre eux (*MpNEP2*), dans la bibliothèque d'interaction cacaoyer-*M. pernicioso* (Gesteira et al., 2007 ; voir § 9.2.6.1). Les protéines *MpNEP1* et *MpNEP2* produites en système hétérologue bactérien, purifiées, et ensuite infiltrées dans des feuilles de tabac ou dans des méristèmes de cacaoyer produisent une nécrose localisée (Fig. 7A) et l'émission d'éthylène (Fig. 7B ; Garcia et al., 2007). La production d'éthylène a été associée à l'hypertrophie (Orchard et al.,

1994), à la dégradation de la chlorophylle et à l'épinastie des pétioles de feuilles et de tiges (Woodrow et al. 1989), symptômes observés durant l'infection du cacaoyer par *M. perniciosa* (Silva et al., 2002) et corrélés à la production d'éthylène chez le cacaoyer (Scarpari et al., 2005). L'analyse de l'expression de *MpNEP1* et 2 montre que *MpNEP2* est exprimé principalement dans le mycélium biotrophe et que *MpNEP1* est exprimé dans le mycélium biotrophe et saprophyte (Garcia et al., 2007). Ces gènes, en particulier *MpNEP2* pourraient agir comme éliciteurs de la nécrose observée chez le cacaoyer (Ceita et al., 2007).

D'autres genes de *M. perniciosa* sont également en cours d'étude: gènes de chitinases (Master de D. S. Gomes, voir § 9.2.8) et de pectinases (Thèse de H. A. S. Carvalho), et permettront une meilleure compréhension du cycle de vie de *M. perniciosa* et de son interaction avec la plante.

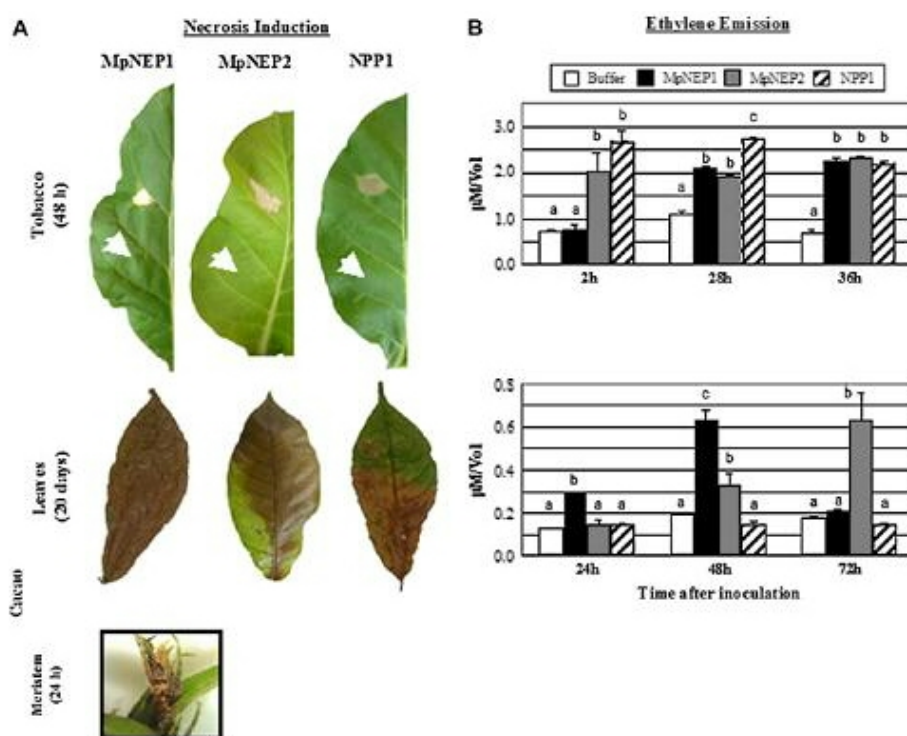


Figure 7. Activité nécrotique et émission d'éthylène induites par les NEPs. **A.** Les NEPs induisent une nécrose dans les feuilles de tabac et les méristèmes de cacaoyer. Photographie du dessus : feuilles de tabac âgées de 90 jours infiltrées avec 20 µl de tampon TNB contenant 1 mM de chaque protéine NEP recombinante, ou seulement le tampon TN (flèche blanche). La photographie a été prise 72h après infiltration. Photographie du milieu : feuilles de cacaoyer inoculées avec les NEPs dans les mêmes concentrations que celles utilisées pour l'infiltration du tabac. L'évaluation a été faite 20 jours après inoculation. Photo du bas : induction de la nécrose au niveau de méristèmes de cacaoyer. Des plantes de la variété Catongo (sensibles à la maladie du balai de sorcière) âgées de 120 jours ont été infiltrées avec 20 µl de solution contenant 1 mM de la protéine recombinante MpNEP1. Après 48h, les méristèmes présentaient une nécrose totale. Les expériences ont été répétées sur au moins 10 méristèmes indépendants. **B.** Emission d'éthylène induite par les NEPs chez des feuilles de tabac et de cacaoyer. Les feuilles de tabac et de cacaoyer fraîchement coupées ont été immergées and 100 ml de la même solution de protéine. Les feuilles ont été enfermées dans un flacon hermétique. Le résultat correspond à la moyenne de trois répétitions \pm erreur standard. a, b ou c représentent les différences significatives entre les traitements ($P < 0,05$). D'après Garcia et al. (2007).

9.2.6. Etudes moléculaires et fonctionnelles de l'interaction cacaoyer-*M. perniciosa*

En 2002, alors que j'initiais l'étude moléculaire de l'interaction cacaoyer-*M. perniciosa*, peu de travaux génomiques et moléculaires avaient été développés sur le cacao (Jones et al., 2002 ; Verica et al., 2004), et aucun d'eux ne visait la compréhension des mécanismes de résistance de la plante à ces principaux pathogènes (e.g. *M. perniciosa*). La première phase de mon projet de recherche portait donc sur l'obtention d'*expressed sequence tags* (ESTs) des interactions cacaoyer-*M. perniciosa* sensible et résistante. Le matériel végétal utilisé avait été au préalable choisi par les chercheurs de l'UESC et de la CEPLAC : TSH1188 comme matériel résistant à *M. perniciosa*, et Catongo, comme matériel sensible. Pour la plupart de nos études, le matériel végétal a été cultivé en serre et inoculé à la CEPLAC avec la souche Cp1441 CEPEC/CEPLAC de *M. perniciosa* (Gesteira et al. 2007). En serre, sur les plantes sensibles, les premiers symptômes apparaissent 4 semaines après inoculation (Ceita et al., 2007 ; Gesteira et al., 2007). Le développement de la maladie est suivi pendant 90 jours. Les meristèmes végétatifs inoculés et non-inoculés de TSH1188 et de Catongo ont été collectés 24, 48 et 72 h après inoculation (HAI) et ensuite tous les 5 jours jusqu'à 90 jours après inoculation (JAI). Les symptômes observés en serre sont semblables à ceux observés au champ (Fig. 8).

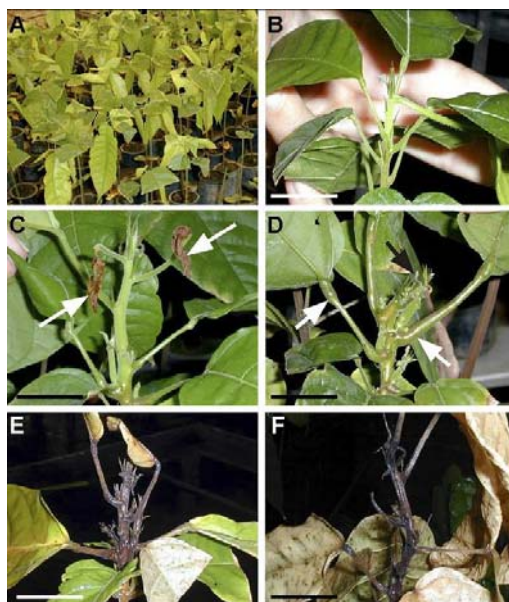


Figure 8. Symptômes de la maladie du balai de sorcière sur cacaoyers infectés et cultivés en serre. **A.** Conditions de culture des plantules de cacaoyer dans la serre de la CEPLAC-BA. **B.** Plantules non inoculées. **C.** Premiers symptômes 30 JAI avec les spores de *M. perniciosa* : dessèchement et nécrose des jeunes feuilles (flèches blanches). **D.** Balais terminaux et axillaires avec renflement du pétiole (flèches blanches), 45 JAI. Flèche noire : hypertrophie du méristème apical et formation des balais axillaires. **E.** Formation du balai sec, 60 JAI. **F.** Balais complètement secs avec feuilles desséchées, 90 JAI. Barre = 2 cm. D'après Ceita et al. (2007).

9.2.6.1. Obtention de banques d'ADNc et séquençage d'ESTs

Dans un premier temps, pour tous les travaux moléculaires entrepris, nous avons été confrontés à des difficultés techniques liées à la présence, chez le cacaoyer, de hautes teneurs en polyphénols et polysaccharides (Figueira et al., 1994 ; Redgwell et al., 2000). Ces molécules, présentes en grandes quantités dans les organes infectés par *M. pernicioso* (fruits, méristèmes), rendent difficile l'extraction des acides nucléiques, et en particulier celle de l'ARN. Plusieurs protocoles d'extraction d'ARN à partir de plantes récalcitrantes existaient déjà (e.g. Schultz et al., 1994) et seulement quelques uns se référaient à l'extraction d'ARN de cacaoyer (à partir de fèves ou de feuilles, qui contiennent moins de polysaccharides que les fruits ou les méristèmes ; Kochhar et al., 2001 ; Jones et al. 2002 ; Laloi et al., 2002). Nous avons donc développé un nouveau protocole d'extraction d'ARN, plus efficace et plus simple que les précédents, utilisant le tert-butanol comme composé permettant la précipitation des polysaccharides (**Gesteira et al., 2003**).

Ensuite, deux banques d'ADNc *full-length* (DB SMART Creator cDNA library kit, Clontech) ont été construites à partir de méristèmes de TSH1188 (banque RT) et de Catongo (banque SP) inoculés avec *M. pernicioso* (**Gesteira et al., 2007**). Un total de 6884 ESTs a été obtenu, correspondant à 2926 séquences non redondantes (2585 singletons et 341 contigs ; Tableau 1). La redondance des banques s'est avérée faible et leur spécificité haute en comparaison avec les autres banques d'ADNc de cacaoyer déjà publiées (Jones et al., 2002 ; Verica et al., 2004 ; Fig. 9). L'analyse bioinformatique a permis d'attribuer une classe fonctionnelle à 54% des séquences, le reste correspondant à des séquences de fonction inconnue (*unknown function*, 22%) ou des séquences sans similarité avec les banques de données (*no hit* ; 24%). Des différences qualitatives entre les deux banques ont été observées et certaines confirmées par analyse d'expression différentielle *in silico* (**Gesteira et al., 2007** ; Tableau 2). L'*unigene* provenant de TSH1188 présente une grande quantité de gènes de résistance (e.g. PR protéines), alors que l'*unigene* provenant de Catongo présente de nombreux gènes en relation avec un processus de mort cellulaire programmée (PCD). Ce dernier résultat confirme les données physiologiques et histologiques observée par **Ceita et al. (2007)** montrant la mise en place, chez les plantes sensibles, d'un mécanisme de PCD favorisant le changement de phase du champignon et sa prolifération.

Il est important de noter que d'autres travaux portant sur l'obtention de banques d'ADNc à partir d'organes infectés par *M. pernicioso* ont été développés et/ou publiés la même année ou l'année suivante de la publication de nos travaux. Entre autres, 866 séquences non redondantes ont été obtenues à partir de cabosses de TSH1188 infectées par *M.*

perniciosa (ADNc *full-length*). Ces séquences s'organisent en 191 contigs et 675 séquences uniques (Gramacho et al., données non publiées). En interaction avec la CEPLAC, nous développons également des banques soustractives (*suppression subtractive hybridization*, SSH ; matériel infecté *versus* matériel non infecté) à partir de cacaoyers résistants génétiquement distants (Pires, 2003 ; Thèse de Livia S. Lima). L'étude de Leal et al. (2007) a consisté en l'analyse de banques SSH obtenues à partir de méristèmes des génotypes sensibles ICS 39 et résistant CAB 214. Un total de 187 et 104 séquences uniques a été obtenu pour ICS 39 et CAB 214, respectivement, et l'expression de certains gènes a été validée par qPCR. En 2008, Argout et collaborateurs ont obtenus 56 banques d'ADNc (*full-length* et SSH) construites à partir de différents organes (fleurs, feuilles, racines, méristèmes, embryon, etc.) et de différents génotypes (e.g. Scavina 6, ICS1, PNG, etc.) soumis à des conditions environnementales variées (e.g. infection par des pathogènes comme *Phytophthora* spp., *M. perniciosa*, *Ceratocystis cacaofunesta* ; stress hydrique). Ces différentes études, dont les séquences sont publiques (ou amenées à l'être en fonction des délais de libération des séquences par les coordinateurs des projets ou bailleurs de fonds⁴), contribuent de façon complémentaire (en terme de génotypes de cacaoyers et de méthodes utilisés) à augmenter les ressources génomiques nécessaires à la compréhension des mécanismes de l'interaction cacaoyer-*M. perniciosa*.

Du fait de la simultanéité de l'obtention de séquences au sein des projets cités ci-dessus (Gesteira et al., 2007 ; Leal et al., 2007 ; Argout et al., 2008), la suite de mon travail n'a été effectuée qu'à partir des banques RT et SP (Gesteira et al., 2007) et des banques obtenues par Gramacho et collaborateurs. Deux approches sont donc actuellement menées en parallèle : i) des études fonctionnelles ayant pour objectif une meilleure compréhension des mécanismes de résistance et de susceptibilité de la plante au champignon ; et ii) l'obtention de marqueurs moléculaires non neutres (SSRs, SNPs) qui pourront potentiellement être utilisés pour la mise en place de stratégies de sélection assistée par marqueurs (SAM).

⁴ Les travaux de Gesteira et al. (2007) ont été financés par le CNPq et la FAPESB (Brésil). Les travaux de Gramacho et collaborateurs ont été financés par la FAPESB (Brésil). Les travaux de Leal et al. (2007) ont été financés par la FAPESP (Brésil). Les travaux d'Argout et al. (2008) sont issus d'un projet de séquençage à grande échelle financé par le Genoscope (France).

Tableau 1. ESTs obtenues à partir des banques d'ADNc des interactions sensible (SP) et résistante (RT). D'après Gesteira et al. (2007).

Library	No. of sequences generated	No. of sequences analysed ¹	Interaction singleton (%) ²	Interaction TC ³	Unigene size (%) ⁴	Mean size of the sequences (bp) ⁵	Redundancy (%) ⁶	Library specific unigenes (%) ⁷	Contribution (%) ⁸
RT	3613	3172 (88)	1520 (48)	199	1719 (54)	341	46	1371 (79.7)	46.8
SP	3271	2852 (87)	1065 (37)	142	1207 (42)	354	58	859 (71.2)	29.3
Total	6884	6024	2585	341	2926	347.5	52	2230	

¹ Vector sequences and sequences of low quality or smaller than 90 bp were eliminated.

² The singletons present in each library independent of other libraries. The percentage was calculated as number of singletons/number of sequences analysed from the library.

³ TC = tentative contig. The contigs present in each library independent of other libraries.

⁴ The unigene set for each library is the sum of singleton plus contigs for the library.

⁵ The mean size of the unigene sequences.

⁶ The redundancy of each library calculated as 1 - (unigene library/number of sequence analysed).

⁷ The unigenes (singletons + contigs) specific to the library. The percentage was calculated as (library-specific unigenes/unigene total).

⁸ The percentage contribution of unigenes specific to each library as a percentage of total unigenes.

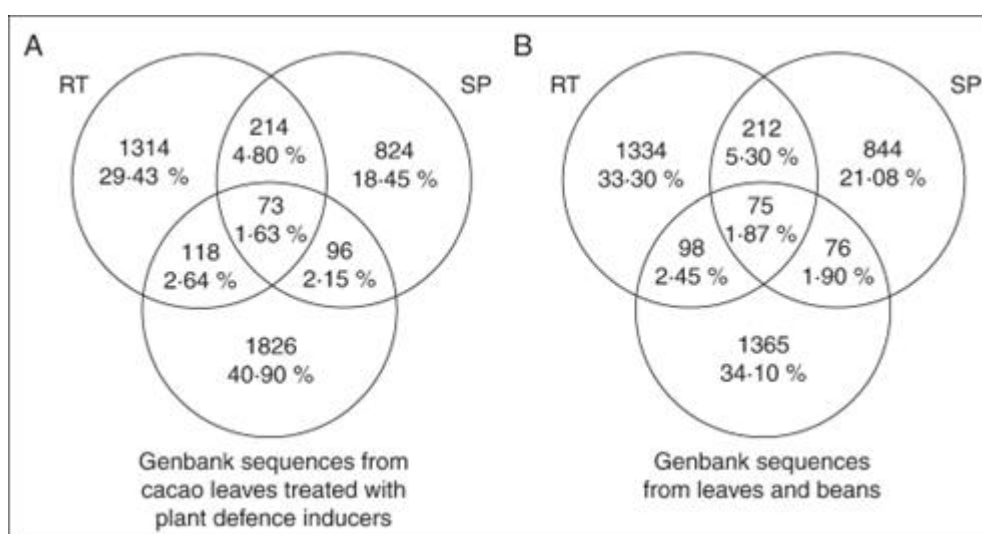


Figure 9. Diagramme de Venn montrant la distribution des séquences présentes dans les banques RT et SP. **A.** D'après Vérica et al. (2004). Les pourcentages ont été obtenus sur la base de la quantité totale de séquences (4465). **B.** D'après Jones et al. (2002). Les pourcentages ont été obtenus sur la base de la quantité totale de séquences (4004). D'après Gesteira et al. (2007).

Tableau 2. Gènes potentiellement impliqués dans des interactions plante-pathogène et différenciellement exprimés entre les deux banques RT et SP selon une analyse statistique *in silico*. D'après Gesteira et al. (2007).

Class ¹	Functional annotation	Species	e-value	Size (bp)	R ² (²)	No. of sequences for RT ³	No. of sequences for SP ⁴
XII.A	Metallothionein	<i>Betula platyphylla</i>	6.10 ⁻²⁶	669	39.73	37*	144*
IX	Trypsin inhibitor	<i>Theobroma cacao</i>	2.10 ⁻⁹³	929	20.52	32*	0
XII.A	Pathogenesis-related protein 4b	<i>Oryza sativa</i>	1.10 ⁻³⁴	1058	14.36	28*	1
II	Ankyrin repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.10 ⁻⁹	625	13.15	1	26*
XII.A	Metallothionein	<i>Petunia × hybrida</i>	2.10 ⁻¹⁶	489	6.66	9*	29*
II	Ankyrin repeat protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	7.10 ⁻⁷	505	3.81	1	10*
XII.A	Pathogenesis-related protein 10	<i>Solanum tuberosum</i>	5.10 ⁻⁴⁸	593	3.74	0	5
XII.A	NPR1/NIM1-interacting protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.10 ⁻⁵	376	2.24	0	3
IX	Subtilase	<i>Lycopersicon esculentum</i>	4.10 ⁻³⁷	538	1.92	3	0

¹ The class numbers correspond to those described in Fig. 3 and in Journet et al. (2002).

² R significant to 0.05 calculated as described previously with 1000 permutations.

³ The number of sequences analysed for the RT library was 3172.

⁴ The number of sequences analysed for the SP library was 2852.

* Sequences listed in the Table 3 as the most expressed in the RT and/or SP libraries.

9.2.6.2. Etudes fonctionnelles

Deux approches ont été développées : i) étude de l'expression des gènes à grande échelle (*arrays*) ; et ii) études fonctionnelles ciblées sur un ou deux gènes (ou famille de gènes) potentiellement impliqués dans l'interaction cacaoyer-*M. pernicioso*.

Les *macroarrays* ont été obtenus par dépôt sur membrane de Nylon (en duplicatas) de produits PCR de la presque totalité des *unigenes* RT et SP (2855 ADNc) (collaboration avec UNESP-Jaboticabal, São Paulo, Brésil). Les hybridations ont été effectuées avec des sondes : i) provenant de méristèmes TSH1188 et de Catongo inoculés ou non inoculés avec *M. pernicioso* (plantes contrôle) et prélevés à 24 HAI, 48 HAI, 72 HAI, 30 JAI et 60 JAI après inoculation ; ii) obtenues à partir d'une étape de transcription *in vitro* (cRNA) afin d'augmenter linéairement la quantité de transcrits utilisée (Wang, 2005) ; iii) provenant de *pools* de répétitions biologiques ; iv) hybridées 3 fois sur les membranes (3 répétitions expérimentales) ; v) hybridées en condition non radioactives (utilisation du kit AlkPhos, Amersham ; chimioluminescence). La détection des signaux et l'intensité des *spots* ont été obtenues grâce au programme BZScan (Lopez et al., 2004) en tenant compte de : i) la soustraction du bruit de fond local pour chaque *spot* ; et ii) l'identification et l'élimination des valeurs des *spots* de mauvaise qualité. A partir des données brutes, une méthode de normalisation non paramétrique et dépendante de l'intensité basée sur l'identification d'un groupe de gènes *self-consistent* (*self-consistent set* ; SCS) a été utilisée (Dawes and Glassey, 2007). Le SCS représente tous les gènes dont l'expression est constante quelques soient les conditions d'inoculation (avec ou sans inoculation par *M. pernicioso*), la cinétique de la maladie (stades précoces, 30 JAI, 60 JAI) ou le génotype utilisé (TSH1188 ou Catongo). A partir des valeurs du SCS, le taux d'expression pour chaque gène a été calculé, converti en base \log_2 et statistiquement analysé. Ont été considérés comme différentiellement exprimés les gènes dont le ratio était supérieur à 2 ou inférieur à -2, et qui se sont avérés statistiquement significatifs (*F*-test ; $P \leq 0.05$). L'agroupement en cluster des gènes présentant le même profil d'expression a été obtenu grâce au programme *CLUSTER package analysis* (Eisen et al., 1998) et visualisé grâce au programme *TreeView*. Les résultats sont présentés Figures 10 et 11 (da Hora Junior et al., article soumis). Huit et neuf clusters d'expression ont été observés pour TSH1188 et Catongo, respectivement. Des gènes potentiellement impliqués dans la résistance ou dans la sensibilité du cacaoyer à *M. pernicioso* ont été identifiés (e.g. *resistance gene candidate RGC2*; *Pathogenesis related protein STH-2/PR10*). L'expression de certains de ces gènes par qPCR est en cours d'obtention. Une meilleure

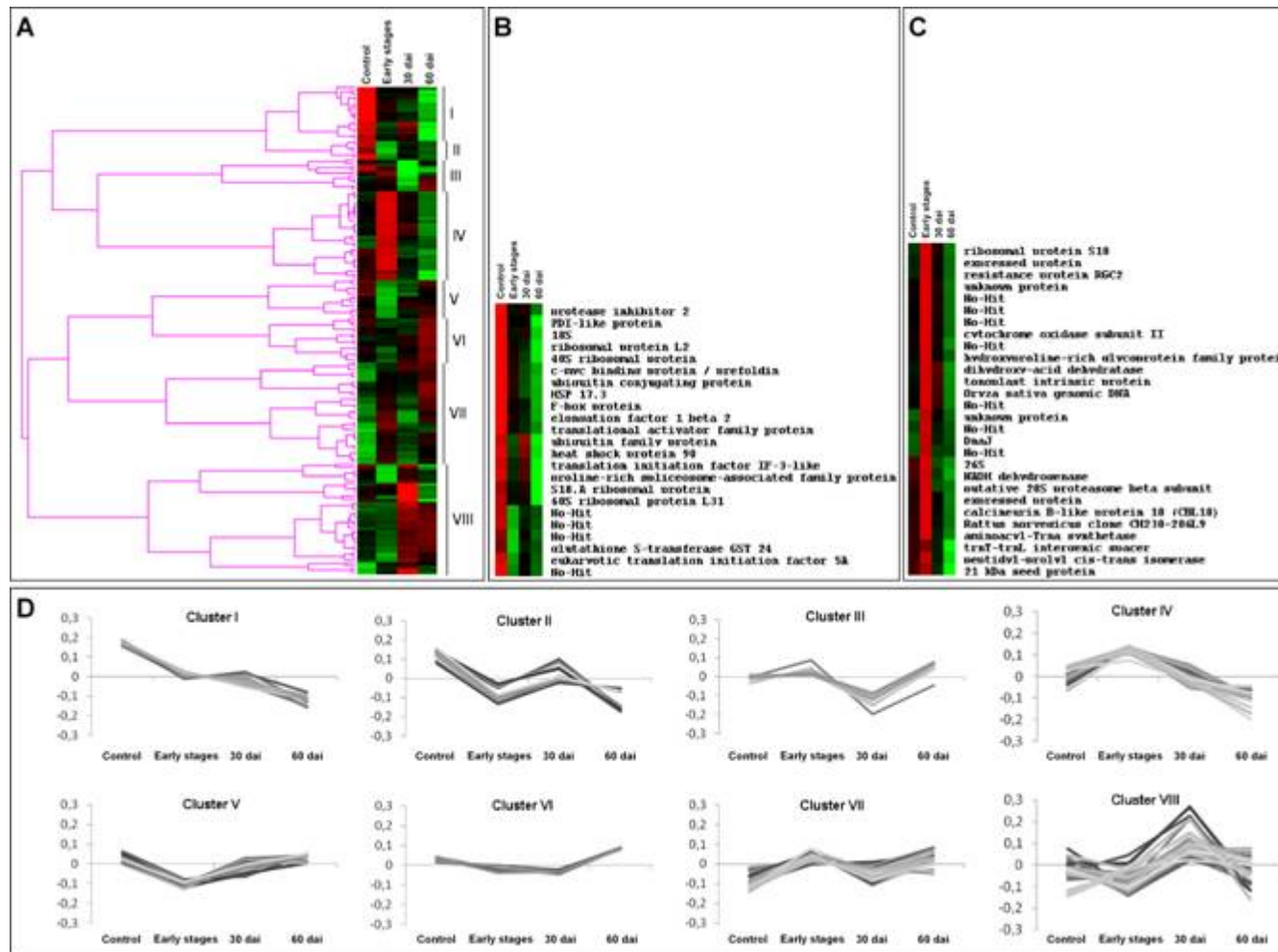


Figure 10. Cluster montrant les groupes de gènes de TSH1188 co-exprimés en réponse à l’infection par *M. perniciosus* aux stades initiaux (Early stages) et à 30 et 60 après inoculation (30 DAI et 60 DAI, respectivement). **A.** Cluster hiérarchique. Chaque colonne correspond à un temps d’infection (Early stages, 30 DAI or 60 DAI) et chaque ligne à un gène. Pour chaque gène, le ratio d’expression dans les tissus inoculée vs contrôle est représenté en rouge ou vert, indiquant respectivement la surexpression ou la répression. Les gènes différemment exprimés ont été classés en 8 profils (clusters) différents numérotés de I à VIII. **B.** Détail du cluster I. **C.** Détail du cluster IV. **D.** Représentation des 9 profils d’expression. L’axe des ordonnées représente la valeur de l’expression du gène normalisé. D’après **da Hora Junior et al., article soumis**.

compréhension de la co-régulation des gènes différentiellement exprimés pourra être obtenue grâce à la biologie des systèmes. Une étude est actuellement en cours en collaboration avec l'Université de Caxias do Sul (Rio Grande do Sul, Brésil).

En parallèle, des études fonctionnelles ont été développées (ou sont en cours de développement) sur des gènes *a priori* intéressants pour comprendre les mécanismes de l'interaction cacaoyer-*M. pernicioso*. Plusieurs gènes sont en cours d'études (e.g. facteurs de transcription), d'autres ont déjà fait l'objet d'analyses plus approfondies (e.g. oxalate oxidase, **Ceita et al., 2007** ; *TcPR10*, **Pungartnik et al., 2009**). Considérant le cas du gène *TcPR10* (= *Pathogenesis related protein STH-2*), ce gène est apparu comme différentiellement exprimé par analyse *in silico* (Tableau 2 ; **Gesteira et al., 2007**) et transcriptomique (Fig. 11 ; **da Hora Junior et al., article soumis**) à 60 JAI chez la plante sensible. La protéine TcPR10 a été surexprimée en système hétérologue (Fig. 12) et son activité testée dans différentes conditions (**Pungartnik et al., 2009**). Il s'est avéré que TcPR10 a une activité ribonucléasique *in vitro* et *in vivo* (Fig. 13) et antifongique contre *M. pernicioso* (Fig. 14). Considérant que le gène *TcPR10* est fortement exprimé chez la plante sensible à 60 JAI (**da Hora Junior et al., article soumis**), et que celle-ci présente des caractéristiques de PCD – rupture de la membrane plasmique, libération du contenu cytoplasmique dans l'apoplasme où se trouve le champignon, qui commence alors à envahir le contenu cellulaire (**Ceita et al., 2007**; **Garcia et al., 2007**) – on peut supposer que TcPR10 pourrait agir directement sur le pathogène, comme une dernière tentative de lutte contre ce-dernier. D'autre part, la PCD observée chez le cacaoyer infecté semble être importante pour le processus de changement de phase biotrophe/nécrotrophe de *M. pernicioso* *in vivo* (**Ceita et al., 2007**). Dans ces conditions, il peut être envisagé également que TcPR10 participe à la PCD, dégradant l'ARN de la plante en conséquence de la stratégie développée par le pathogène pour terminer son cycle. Cette hypothèse tient compte du fait que TcPR10 présente *in vitro* une activité RNase également contre l'ARN de cacaoyer (**Pungartnik et al., 2009**).

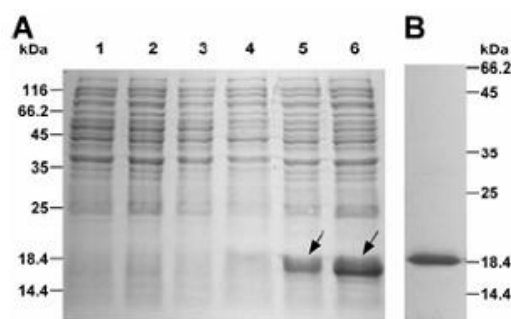


Figure 12. Gel SDS-PAGE de la production de la protéine TcPR10 en système hétérologue bactérien. **A.** Expression de TcPR10 recombinante (avec queue HIS) chez *Escherichia coli* BL21(DE3). Puits 1 : pET28a sans insert et sans induction; puits 2 : pET28a sans insert 3 h après induction; puits 3 : pET28a-TcPR-10 sans induction ; puits 4 : pET28a-TcPR-10 1 h après induction ; puits 5 : pET28a-TcPR-10 2 h après induction ; puits 6 : pET28a-TcPR-10 3 h après induction. Les flèches indiquent la bande correspondant à la protéine TcPR10. **B.** TcPR10 recombinante purifiée (18,4 kDa). D'après **Pungartnik et al. (2009)**.

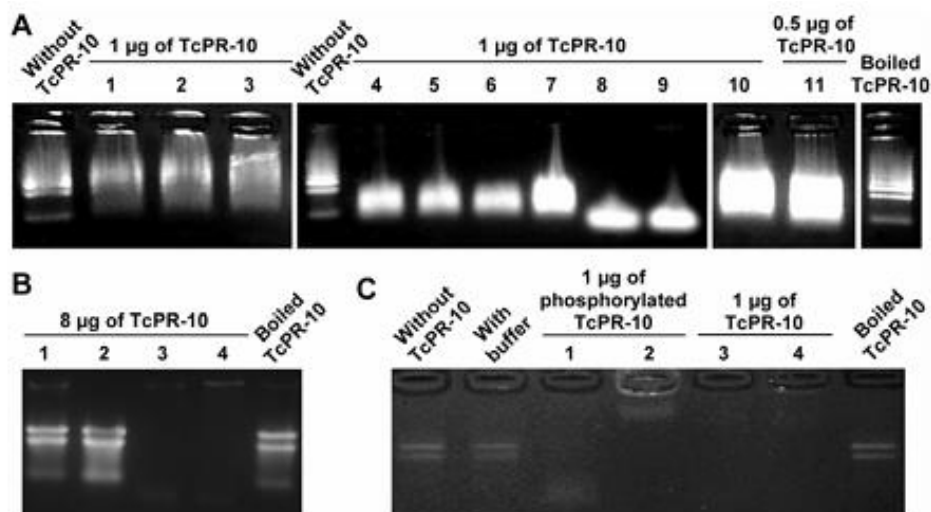


Figure 13. Activité RNase de la protéine recombinante TcPR10. **A.** Activité RNase *in vitro* sur l'ARN de *M. perniciosa*. TcPR-10 (1 or 0.5 µg) a été incubée pendant des temps différents avec 1 µg d'ARN de *M. perniciosa* à 25°C. Temps d'incubation : puits 1, 2 min; puits 2, 4 min; puits 3, 8 min; puits 4, 15 min; puits 5, 30 min; puits 6, 1 h; puits 7, 2 h; puits 8, 4 h; puits 9, 6 h; puits 10, 16 min; et puits 11, 32 min. L'ARN a également été incubé 6h sans TcPR-10 et avec 1 g de TcPR-10 dénaturée. **B.** Activité RNase *in vivo* sur *M. perniciosa*. TcPR-10 (8 µg) a été incubée avec des pseudo-colonies de *M. perniciosa* à 25°C pendant des temps différents. Ensuite, l'ARN du champignon a été extrait et analysé sur gel d'électrophorèse RNase-free. Temps d'incubation : puits 1, 15 min; puits 2, 30 min; puits 3, 1 h; et puits 4, 24 h. Les pseudo-colonies ont également été incubées 24 h sans TcPR-10 et avec 8 g de TcPR-10 dénaturée. **C.** Activité ribonucléase *in vitro* sur l'ARN de cacaoier. TcPR-10 (1 µg) phosphorylée (puits 1 et 2) et non phosphorylée (puits 3 et 4) a été incubée avec l'ARN de cacaoier à 25°C pendant des temps différents : puits 1 et 3, 1 h; et puits 2 et 4, 6 h. L'ARN de cacaoier a également été incubé pendant 24 h sans TcPR-10, seulement en présence de tampon, et avec 1 g de TcPR-10 dénaturée. D'après **Pungartnik et al. (2009)**.

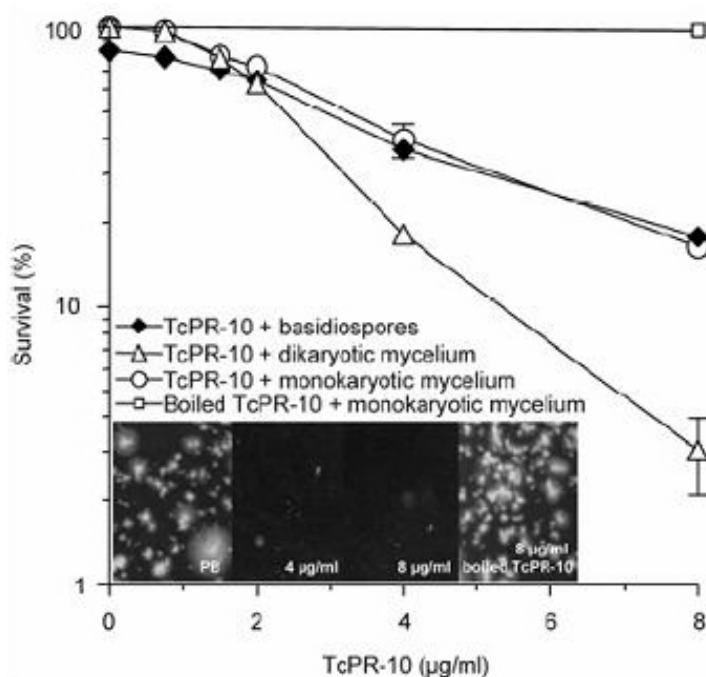


Figure 14. Effet de TcPR-10 sur la croissance et la germination de *M. perniciosa*. La survie des pseudo-colonies provenant de mycélium monokaryotique et dikaryotique et la survie des basidiospores a été testée en présence différentes concentration de TcPR-10. Les photographies montrent la morphologie des pseudo-colonies monokaryotique de *M. perniciosa* après exposition à TcPR-10 (4 et 8 µg/ml) et aux conditions contrôles (exposition au tampon phosphate et à 8 µg/ml de protéine TcPR-10 dénaturée). D'après **Pungartnik et al. (2009)**.

Considérant les gènes actuellement en cours d'étude, et les analyses de transcriptomique, d'autres gènes d'intérêt potentiellement impliqués dans la résistance du cacaoyer à *M. perniciosa* (e.g. *Resistance Gene Candidate RGC2*) pourront être étudiés fonctionnellement. Une des difficultés consiste en la validation des résultats obtenus *in planta*. Même s'il a déjà été démontré qu'il est possible de cultiver le cacaoyer *in vitro* et de le transformer (Maximova et al., 2003 ; Maximova et al., 2006), ce type d'études se heurte : i) au faible rendement d'obtention de transformants et régénérants de cacaoyers ; ii) au temps relativement long d'obtention de plantes transformées (≈ 6 mois) ; et iii) à l'opinion des consommateurs et du monde du chocolat (producteurs et chocolatiers) vis-à-vis des organismes génétiquement modifiés, même si ceux-ci ne sont pas destinés à la commercialisation mais seulement à être utilisés comme outils de recherche. C'est pourquoi, dans un but de compréhension des mécanismes d'interaction cacaoyer-*M. perniciosa in planta*, il était important de développer un système d'étude modèle plus simple et efficace que le propre pathosystème cacaoyer-*M. perniciosa*. Sachant que les solanacées, et la tomate en particulier, sont hôtes du biotype S de *M. perniciosa*, il était facile d'envisager d'utiliser le pathosystème tomate-*M. perniciosa* comme pathosystème modèle de l'interaction cacaoyer-*M. perniciosa*. Plusieurs variétés de tomate (Santa Clara, MicroTom), stades de développement et concentrations de spores ont été testés (Fig. 15). Les premiers symptômes (renflement de la tige) sont apparus environ 20 JAI (Fig. 15D), et les premiers symptômes de nécrose 100 JAI (Fig. 15F). La mort de la plante est observée 120 JAI (Thèse de M. A. Lopes).

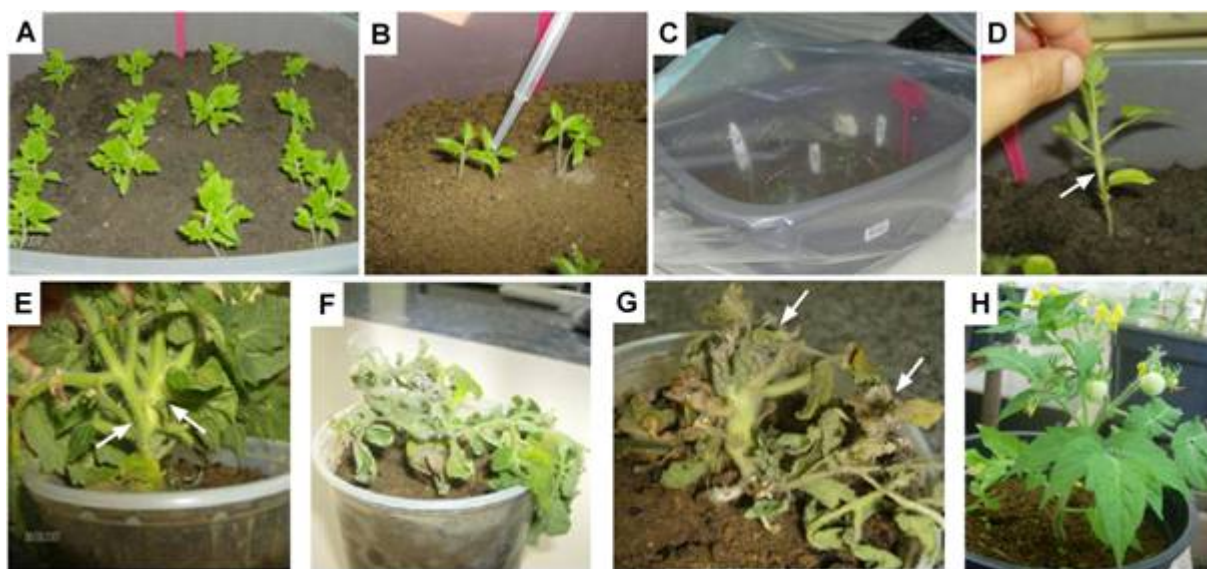


Figure 15. Plantes de tomate de la variété Micro-Tom. **A.** Plantules d'environ 30 jours. **B.** Inoculation avec une goutte de spores de *M. perniciosa*. **C.** Incubation des plantules inoculées en atmosphère humide. **D.** Plante présentant les premiers symptômes de la maladie (renflement de la tige, flèche). **E.** Formation du balai vert avec renflement des tiges et rétrécissement des entre-nœuds (flèches). **F.** Plante présentant les premiers symptômes de nécrose. **G.** Plante nécrosée (flèches). **H.** Plante non infectée.

9.2.7. Données génétiques de l'interaction cacaoyer-*M. pernicios*

Plusieurs cartes génétiques du cacaoyer ont été développées afin d'associer des marqueurs moléculaires à des caractéristiques quantitatives (*quantitative trait loci* ; QTLs), comme la qualité ou à la résistance à *Phytophthora* (Lanaud et al., 1995; Crouzillat et al., 1996, 2000a, 2000b; Risterucci et al., 2000; Pugh et al., 2004 ; Clément et al., 2003a, 2003b). Plus récemment, Queiroz et al. (2003), Faleiro et al. (2006) et Brown et al. (2005) ont développé des cartes génétiques associées à la résistance à la maladie du balai de sorcière à partir de la population issue du croisement SCA6 x ICS1 mis en place à la CEPLAC-BA. Malgré une étude récente de l'interaction cacaoyer-*M. pernicios* suggérant que la résistance à la maladie serait due à un gène récessif majeur unique, homozygote chez SCA6 (Shaw and Vandenbon, 2007), d'autres études s'accordent à penser que la résistance au balai de sorcière est oligogénique (Brown et al., 2005 ; Faleiro et al., 2006). A partir : i) de la population F2 citée ci-dessus (SCA6 x ICS1) ; ii) d'une matrice de génotypage obtenue essentiellement avec des marqueurs microsatellites neutres et quelques gènes candidats ; et iii) du dénombrement de balai végétatifs entre 1997 et 2002, un QTL majeur a été identifié sur le groupe de liaison 9 près du locus mTcCIR35. Ce QTL explique jusqu'à 51% de la variance phénotypique de la résistance (Queiroz et al., 2003 ; Brown et al., 2005 ; Faleiro et al., 2006). De plus, un QTL mineur a été détecté sur le groupe de liaison 1, près d'un locus RGA (*Resistance Gene Analog*) (Brown et al., 2005). Des études de cartographie de QTL à partir d'autres sources de résistance sont en cours : i) utilisation d'une population liée en partie à la source résistance SCA : TSH1188 x CCN51 ; et ii) utilisation de populations obtenues par croisements de clones CAB (possédant une base génétique différente de SCA) (Albuquerque, 2006). Dans le but de développer une cartographie basée sur le clonage positionnel (*map-based cloning*) et de caractériser la région du QTL par l'identification des gènes impliqués dans l'expression de la résistance, il est important d'obtenir : i) une carte génétique saturée de la région du QTL impliquée ; et ii) des informations sur la structure physique du génome. Pour cela une banque BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) de cacaoyer – composée de 36.800 clones d'ADN et couvrant 10 fois le génome – a été produite par le Cirad (Clément et al., 2004). L'autre aspect, concerne l'obtention de nouveaux marqueurs moléculaires non neutres pouvant être utilisés : i) dans diverses études de cartographie génétique ; ii) pour établir des cartographies génétiques fines, à partir de population de grand effectif (cas de la collaboration Cirad-CEPLAC qui met en place une nouvelle population F2 SC6 x ICS1) ; et iii) pour des études de diversité. Les ressources moléculaires obtenues (cDNA, ESTs ; voir § 9.2.6.1) peuvent servir de base à l'identification de marqueurs moléculaires (e.g. SSRs, SNPs) utilisables dans les domaines cités précédemment et, à plus long terme, pour l'aide à la sélection de cacaoyers résistants au balai de sorcière. L'intérêt d'utiliser des marqueurs non neutres, est que ceux-ci sont localisés dans des régions exprimées.

Leurs cartographie génétique permettrait de vérifier si ces gènes se co-localisent avec l'un des QTLs observés pour la maladie du balai de sorcière, validant l'importance de ces gènes pour la résistance du cacaoyer à *M. pernicioso*. A partir des ESTs obtenues à l'UESC (2926 séquences ; **Gesteira et al., 2007**) et à la CEPLAC (866 séquences ; Gramacho et al., données non publiées), environ 500 EST-SSRs ont été identifiés et 11 d'entre eux détectent un polymorphisme entre 20 génotypes de cacaoyers présentant différentes résistances au balai de sorcière (Tableau 3 ; **Lima et al., 2008**). Ces 11 EST-SSRs sont essentiellement localisés dans l'ORF ou dans la région 5'UTR des gènes correspondants (Thèse de Livia S. Lima). Deux de ces 11 EST-SSRs (msEstTsh-12 et msEstTsh-6) ont été cartographiés sur le groupe de liaison 2 de la descendance F2 (SCA6 x ICS1) (Collaboration D. Clément Cirad/CEPLAC). En parallèle une recherche bioinformatique de SNPs a été effectuée à partir de 153 séquences provenant des mêmes banques d'ADNc mais sélectionnées sur la base de leur fonction putative (gènes potentiellement impliqués dans la résistance). Après analyse et élimination de faux-positifs, 11 séquences contenant 71 SNPs putatifs ont été obtenus. Des SNPs de type transversion et transition ont été observés même si la quantité de SNPs de type transition (62%) est supérieur à la quantité de SNPs de type transversion (38%). Une grande quantité de SNP a été observée dans les ORFs (44%) et dans la région 5'UTR (32%) et la fréquence de SNPs synonymes (42%) est plus haute que la fréquence de SNPs non synonymes (34%) (Thèse de Livia S. Lima). Une validation de ces SNPs, probablement par le système TaqMan[®], devra encore être effectuée.

Tableau 3. Caractéristiques des primers correspondants aux 11 loci microsatellites obtenus à partir des ESTs de l'interaction cacaoyer-*M. pernicioso*. D'après **Lima et al. (2008)**.

GenBank accession number	Name	Primer sequence (5'-3')	T_a (°C)	Repeat type	Size	Size range (bp)	No. of alleles	H_o	H_e	SSR location
AMR51097	maEstTsh-1	F: CACGAAGAAGTGGACGAT R: CACATGGCTTGACTGGAA	56.8	(AT) ₉	192	192-200	3	0.0	0.50	nd
AMR51098	maEstTsh-2	F: ATTCCCTGCCCTCTTACG R: CCAGATGTGGATGCGGAT	62.0	(CT) ₉	92	90-96	4	0.33	0.65	5' UTR
AMR51096	maEstTsh-3	F: CGGGGAATCTCACACATA R: ATCCTGGTTGGTGAGCTA	56.8	(CT) ₉	104	102-112	6	0.31	0.49	ORF
AMR51099	maEstTsh-4	F: ATATCTCCACCACCACAG R: CCGGAGAATGTAGAACCT	59.5	(TA) ₅ (AC) ₄	179	173-179	3	0.0	0.16	ORF
AMR51100	maEstTsh-5	F: ACGACTTTAGGAGCTGACC R: AACTTCAACACCAAGACCAT	TD 60-48	(ACC) ₄	290	290-302	4	0.14	0.26	ORF
AMR51101	maEstTsh-6	F: ATGAATATTGTGGAGGAGGTT R: TAGCAGTGCTTACAGCTCAA	TD 60-48	(AGA) ₇	212	212-229	4	0.58	0.70	nd
AMR51102	maEstTsh-7	F: GGAGCTGTTAGGAGAATGC R: AGACCAGGAAAGAAGAGTCC	TD 60-48	(CTT) ₂ (CTG) ₄	158	149-161	4	0.25	0.62	nd
AMR51103	maEstTsh-8	F: AACCCTTCATGAGACAATGA R: CAGTCCCTTCCTTCTGTGA	TD 60-48	(TGC) ₇	190	190-193	2	0.05	0.05	ORF
AMR51104	maEstTsh-9	F: CACTTTGACACTTCAAGCA R: TCAAAATCTGACCCATAAC	TD 60-48	(TC) ₁₃	206	206-210	3	0.67	0.57	nd
AMR51105	maEstTsh-10	F: ACCCCTCAATCTCACACATA R: GCTTGGCGCTCTTAGTATC	TD 60-48	(CT) ₁₀	156	156-174	5	0.47	0.70	5' UTR
AMR51106	maEstTsh-11	F: GGAGAAACACTCTCATGTC R: CTTTCTTCAAAGAAGGAAACAT	TD 60-48	(TAC) ₁₀	209	209-218	4	0.41	0.65	3' UTR
Mean	-	-	-	-	-	-	3.81	0.29	0.48	-

Repeat motifs are listed as 5'-3' with respect to the forward (F) and reverse (R) primer. T_a is the annealing temperature. Expected heterozygosity was computed according to Nei (1973). The primer sequences and size range in bp for each locus is given. H_o and H_e represent the number of observed heterozygosity and expected heterozygosity (per locus and genotypes), respectively. nd, not determined; ORF, open reading frame; UTR, untranslated region

Les résultats d'analyses de variabilité génétique de *M. pernicioso* par des approches moléculaires donnent des éléments en faveur d'une grande diversité génétique de *M. pernicioso* entre isolats de pays différents, de régions différentes au sein d'un même pays, de municipalités d'une même région cacaoyère, et de différentes parties d'une même plante (Anderbrhan and Furtek, 1994 ; Anderbrhan et al., 1999 ; Niella et al., 2000 ; Gomes et al., 2000 ; Gramacho et al., 2002 ; Arruda et al., 2003a,b ; Ploetz et al., 2005 ; Rincones et al., 2006 ; Gramacho et al., 2006, 2007). Cette variabilité associée à la présence de transposons dans le génome de *M. pernicioso*, à la monoculture du cacaoyer, à la présence constante d'hôtes sensibles dans la région de Bahia, et aux conditions environnementales propices au développement de la maladie, favorise la fixation de souches mutantes et classe *M. pernicioso* dans une catégorie de champignon à haut risque évolutif pouvant facilement contourner la résistance de l'hôte. Les mutations pourraient être le mécanisme le plus efficace rencontré par le champignon pour créer de la variabilité et s'adapter à l'introduction dans les plantations de nouvelles populations d'hôtes. Face à un parasite hautement diversifié dont la dissémination se fait uniquement par la mise en place de la forme sexuée, le programme d'amélioration du cacaoyer de la CEPLAC s'est orienté vers la mise place de stratégies d'inclusion d'autres allèles de résistance pour contrecarrer l'évolution du pathogène. L'amélioration génétique, dans le but d'obtenir une résistance durable à la maladie du balai de sorcière, doit passer par l'identification de gènes provenant de diverses sources de résistance et l'accumulation de ceux-ci (allèles favorables) dans une unique variété de cacaoyer *via* une stratégie de *pyramiding*. Dès 2000, J.L. Pires, chercheur à la CEPLAC, a analysé 727 génotypes de cacaoyer en relation à résistance à la maladie du balai de sorcière (573 clones appartenant à la collection de la CEPLAC, et 154 clones sauvages provenant d'Equateur, de l'Amazonie brésilienne, du Pérou et de la Guyane Française). A l'aide de marqueurs RAPD, il a montré qu'il existe, parmi les génotypes résistants, une grande quantité de génotypes de différentes origines se démarquant des variétés traditionnellement rencontrées ou utilisées pour la production des variétés hybrides distribuées dans la région de Bahia (Pires, 2003). Il a également constaté que les matériels résistants distants génétiquement de SCA sont amplement distribués au sein de l'espèce, suggérant des possibilités de mécanismes de résistance évolutivement distincts (Pires, 2003). En collaboration avec la CEPLAC, des banques soustractives (matériel infecté *versus* matériel non infecté) ont été construites à partir de 6 de ces génotypes de cacaoyer distants génétiquement de SCA6 et sont en cours de séquençage (voir § 9.2.6.1), afin d'essayer d'identifier, par comparaison *in silico*, des gènes candidats à partir de l'un ou l'autre de ces matériels résistants (Thèse de Livia S. Lima).

9.2.8. Données biochimiques et protéomiques

En parallèle des études de génomique, j'ai commencé à aborder l'étude de l'interaction cacaoyer-*M. pernicioso* par protéomique et analyse d'activités enzymatiques. Une des premières étapes, préalable à ces approches, a été la mise au point de différentes méthodes d'extraction de protéines du cacaoyer afin d'éliminer les polysaccharides empêchant des études en 1-D ou 2-D (**Pirovani et al., 2008**). Tout comme dans le cas de l'extraction d'acides nucléiques, le développement de ces méthodes s'est avéré nécessaire et préalable aux expériences de biochimie et protéomique. Ce travail, issu du Master de H. A. S. Carvalho, lui a valu l'obtention du second prix d'Innovation Technologique (catégorie Doctorant) de la FAPESB⁵, d'une valeur de R\$ 5.000.

Sur l'agent pathogène, l'approche enzymatique a également été utilisée pour une meilleure compréhension de son cycle de vie et dans le but de détecter des mécanismes clés pouvant être la cible de stratégies de lutte. Ainsi, nous avons montré que l'activité enzymatique de chitinases de *M. pernicioso* est régulée *in vitro* en fonction des conditions de culture (source de carbone et de nitrogène ; Fig. 16) et en fonction du temps d'incubation, et qu'il existe une relation inverse entre l'activité chitinases et la croissance mycéliale de *M. pernicioso* (**Lopes et al., 2008**). Ces résultats suggèrent que le milieu de culture, par induction ou répression des chitinases, affecte la croissance du mycélium, et que les chitinases pourraient donc constituer un élément important pour la mise en place de méthodes de lutte contre *M. pernicioso*. Ces résultats ont été récemment confirmés par l'étude de l'expression de deux gènes de chitinases de *M. pernicioso* durant le développement du champignon cultivé sur galette (voir § 9.2.5) : i) le gène *MpChit1* est exprimé lors de la croissance du mycélium et lors de la formation du basidiocarpe ; ii) le gène *MpChit2* est essentiellement exprimé lors de la formation du primordium (Master de D. S. Gomes).

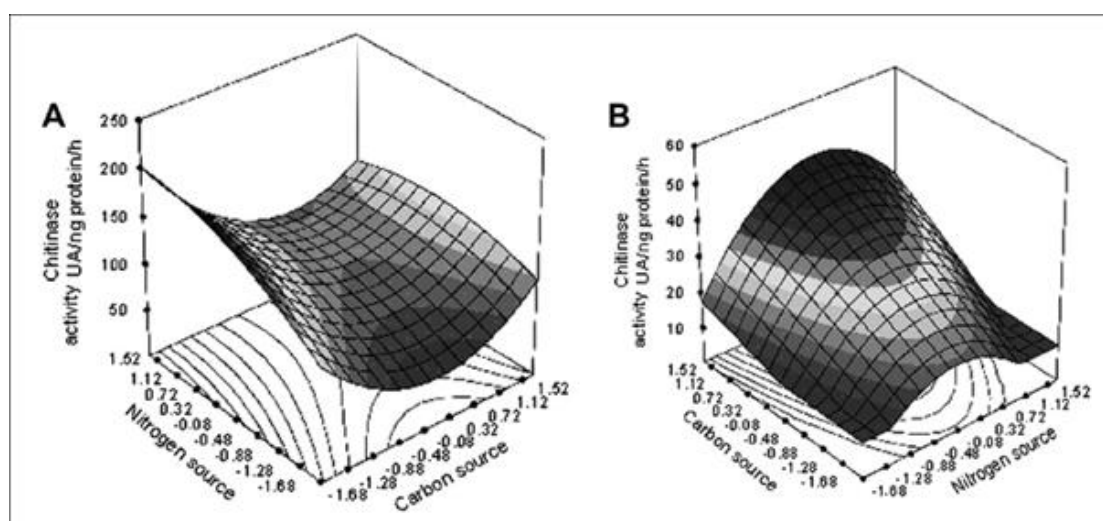


Figure 16. Activité chitinase de *M. pernicioso* en fonction des sources de nitrogène et de carbone (valeur codées). **A.** Mycélium. **B.** Milieu de culture. D'après **Lopes et al. (2008)**.

⁵ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, <http://www.fapesb.ba.gov.br/>

D'autres activités enzymatiques sont en cours d'étude (e.g. protéases du cacaoyer, pectinases du champignon) à la fois comme possibles éléments participant aux mécanismes de résistance/sensibilité de la plante, ou d'infection de la plante par le champignon, mais aussi comme base pour le développement de produits biotechnologiques (e.g. superexpression en système hétérologue d'enzymes utilisables dans l'industrie). Ce type d'approche, bien que n'étant pas directement lié à l'étude du pathosystème, présente des avantages en terme : i) obtention de financements auprès de bailleurs de fonds privés ou axés sur le développement de produits commerciaux (e.g. BNB⁶) ; ii) dépôt de brevets pouvant éventuellement générer des ressources propres ; et iii) développement de produits potentiellement transférables à d'autres cultures ou pathogènes (e.g. fongicides).

9.3. CONSIDERATIONS SUR LE CONTEXTE DE DEVELOPPEMENT DES ACTIVITES DE 2002 A AUJOURD'HUI, ET CONCLUSIONS

Comme annoncé précédemment, ces travaux ont été développés dans le cadre de mon expatriation au Brésil (de 2002 à aujourd'hui), et en collaboration avec (principalement) deux institutions brésiliennes, l'UESC et la CEPLAC-BA. Le groupe de Génétique et d'Expression Génique de l'UESC avait été récemment créé (2000) et contenait peu de chercheurs, de professeurs et d'étudiants. Aujourd'hui, ce groupe, sous la responsabilité du Dr. Júlio César de Mattos Cascardo, est constitué de jeunes chercheurs ayant été recrutés au cours des 10 dernières années. Ces chercheurs ont donc été amenés très jeunes et très tôt dans leur carrière à assumer des responsabilités généralement assumées, dans des institutions plus anciennes, par des chercheurs « Senior » ayant déjà 10 ou 20 ans d'activités scientifiques. De plus, l'Ecole Doctorale en Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC a également été initiée récemment (après validation par la CAPES⁷, organisme national de gestion des Ecole Doctorales) : le niveau Master (*Mestrado*⁸) existe depuis 2002 et le niveau Doctorat (*Doutorado*⁶) depuis 2006. Dans ce contexte, les enseignants-chercheurs de l'UESC ont donc également été amenés à encadrer tôt dans leur carrière des étudiants de Master et plus récemment de Doctorat. Ayant été intégrée dans ce contexte universitaire, il m'a donc été attribué (comme à mes collègues brésiliens) un certain nombre de responsabilités dont l'encadrement d'étudiants de 2nd et de 3^{ème} cycle. Aujourd'hui, je suis en charge d'une « petite équipe » constituée de cinq étudiants de Doctorat, d'un étudiant de Master (sachant que 5 étudiants de Master ont déjà soutenu leur dissertation) et de plusieurs étudiants de 2nd cycle (de 1 à 3 par an). Bien que ne fonctionnant pas exactement sur le même système qu'en

⁶ Banco do Nordeste, http://www.bnb.gov.br/Content/Aplicacao/Grupo_Principal/Home/Conteudo/PortalBN.asp

⁷ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, <http://www.capes.gov.br/>

France (obtention de l'HDR), l'autorisation à encadrer des étudiants de 3^{ème} cycle n'est pas attribuée à tous les chercheurs mais seulement à certains, après analyse de leur *curriculum vitae* par la commission de l'Ecole Doctorale et seulement après avoir montré satisfaction dans le co-encadrement d'un étudiant de Master. L'encadrement d'étudiants n'est toutefois possible que si des financements permettent le développement des expériences. Durant les 2 première années (2002-2004), j'ai eu la possibilité de travailler à partir de financements obtenus par des collègues brésiliens ; à partir de 2004, j'ai moi-même réussi à obtenir mes propres financements auprès de bailleurs de fonds brésiliens ainsi que des bourses d'étude pour les étudiants de 2nd et 3^{ème} cycles (FAPESB, CNPq⁹, BNB). Une partie de mes activités a donc consisté en la rédaction de projets de recherche, et après obtention de ceux-ci, de rapports techniques et financiers.

Au niveau administratif (activités liées ou non à la recherche), mes responsabilités ont été en s'amplifiant au cours des 6 dernières années. Entre autre, je suis depuis mars 2008, Vice-Coordinatrice de la *Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular* de l'UESC (Ecole Doctorale en Génétique et Biologie Moléculaire¹⁰), au côté de Ronan Xavier Corrêa (Coordinateur). L'Ecole Doctorale Génétique et Biologie Moléculaire participe à la formation depuis 2002 d'étudiants de Master et depuis 2006 de Docteurs dans le domaine de la génétique classique et de la biologie moléculaire végétale et animale. Cette formation (2 et 4 ans, pour le Master et le Doctorat, respectivement) comprend des cours théoriques (modules) et le développement d'un projet de recherche (en laboratoire et/ou sur le terrain) sous la responsabilité d'une commission d'orientation (encadrant principal, co-encadrant et conseiller). Les diplômes de Master et de Doctorat sont obtenus après analyse d'un mémoire (dissertation ou thèse) et après soutenance des travaux de recherche devant un jury composé de membres externes et internes à l'UESC. D'autres critères, comme la soumission d'un article scientifique de rang A, sont nécessaires pour l'obtention du diplôme. La fonction de coordination et vice-coordination de l'Ecole Doctorale consiste en : i) obtention et gestion de bourses d'étude auprès de bailleurs de fonds spécifiques (e.g. CAPES, CNPq, FAPESB) ; ii) gestion des fonds attribués par l'UESC à l'Ecole Doctorale ; iii) organisation des cours théoriques dispensés aux étudiants ; iv) organisation et participation au processus de sélection des étudiants ; v) organisation des soutenances ; vi) adéquation et maintien de l'Ecole Doctorale aux critères de qualité requis par la CAPES. Cette activité s'avère très enrichissante et m'a permis d'acquérir plus d'expérience au niveau : i) gestion administrative d'une structure académique ; ii) relations avec des organismes nationaux brésiliens

⁸ Le système universitaire brésilien consiste en 4 ou 5 années de 2nd cycle (*Graduação*) selon la filière (Biologie, Agronomie, etc.), 2 années de *Mestrado* (après le 2nd cycle) et 4 années de *Doutorado* (après le *Mestrado*). Le *Mestrado* et le *Doutorado* sont effectués sous couvert d'une *Pós-Graduação* (≈ Ecole Doctorale).

⁹ *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*, <http://www.cnpq.br/>

¹⁰ http://www.uesc.br/genetica/index.php?item=conteudo_colegiado.php

(e.g. CAPES) ; iii) management des encadrants en relation avec la nécessité d'augmenter la qualité des publications de l'Ecole Doctorale.

Au niveau scientifique, lorsque j'ai intégré la thématique « balai de sorcière » peu d'éléments étaient connus sur le sujet en terme de génomique, de biologie moléculaire et de protéomique. De nombreuses données « empiriques » ou peu divulguées (revues locales brésiliennes) étaient détenues par la CEPLAC dans des domaines touchant surtout à l'agronomie, la physiologie et l'amélioration du cacaoyer. Nos premiers travaux ont donc consisté au développement de méthodologies nécessaires à l'étude aussi bien du cacaoyer que de *M. pernicioso* (e.g. protocole d'extraction d'ARN de cacaoyer ; protocole d'extraction de protéines ; protocoles de culture de *M. pernicioso* ; pathosystème modèle tomate-*M. pernicioso*). Dans un second temps, nous avons généré des données moléculaires à « grande échelle », certaines de façon pionnière (e.g. banques d'ADNc, macroarrays). Aujourd'hui nous sommes dans la phase probablement la plus intéressante, qui consiste à pouvoir analyser ces données et commencer à approfondir nos études pour comprendre les mécanismes moléculaires de résistance/susceptibilité du cacaoyer à *M. pernicioso*. Ceci est également vrai en ce qui concerne l'analyse du champignon, et également en ce qui concerne l'obtention de marqueurs moléculaires, outils qui pourront être utilisés ultérieurement en SAM. D'un autre côté, le contexte actuel est très différent de celui de 2002, puisque plusieurs institutions (Cirad, UESC, Ceplac, Unicamp¹¹, Cena¹²) ont investis dans l'étude de l'interaction cacao-*M. pernicioso* au travers de projets de recherche locaux (e.g. projets brésiliens) ou internationaux (e.g. Projet Genoscope coordonné par le Cirad) la plupart en collaboration (e.g. Cirad-UESC-Ceplac). Les données moléculaires et physiologiques de l'interaction sont donc aujourd'hui beaucoup plus importantes et amènent à réfléchir aux stratégies de recherches qui devront être développées dans les prochaines années. En particulier, les approches menées dans le contexte de la collaboration Cirad-UESC-Ceplac forment un éventail de sujets de recherche complémentaires, mais vastes, couvrant : i) l'étude de la plante et du champignon ; ii) des approches de recherche fondamentale (e.g. étude fonctionnelle de gènes) et appliquées (e.g. cartographie) ; iii) des techniques allant de la biologie moléculaire à la génétique classique, en passant par la biochimie ; iv) des études à large échelle (e.g. macroarrays) et des études plus pointues ciblées sur un ou deux gènes candidats (e.g. PR10). Une des premières étapes de ma réflexion consiste peut être à identifier les sujets de recherche « porteurs » pour les prochaines années en fonction du contexte scientifique international, et à recentrer mes travaux sur quelques domaines d'étude. Cela impliquerait donc un désengagement et une réduction de mon investissement en relation à certaines analyses, comme par exemple :

¹¹ Universidade Estadual de Campinas, <http://www.unicamp.br/unicamp/>

¹² Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP Campus Piracicaba, <http://www.cena.usp.br/>

- Etudes biochimiques et enzymatiques de la plante et du champignon. Les travaux consistant en l'analyse des chitinases de *M. pernicioso* et des protéases du cacaoyer pourront petit à petit être transférés à d'autres chercheurs de l'UESC compétents sur le sujet (e.g. Carlos Priminho Pirovani qui vient de soutenir sa thèse sur les cystatines de cacaoyer).
- Identification de marqueurs moléculaires. En effet, l'obtention et le génotypage à grande échelle de SNPs (Illumina Technologies) est actuellement en cours au Cirad (projet coordonné par Claire Lanaud) à partir des séquences obtenues au sein du projet Genoscope (voir § 9.2.6.1) et de la descendance F2 SCA6 x ICS1 mise en place à la CEPLAC. Ce travail développé en collaboration entre les deux institutions et impliquant Didier Clément (Cirad/CEPLAC) constituera une base solide pour le développement d'approches de SAM.

9.4. PROJET DE RECHERCHE : CONTINUATION DE L'ETUDE DE L'INTERACTION CACAoyer- MONILIOPTHORA PERNICIOSA

Mon projet HDR se situe dans la continuation des études moléculaires de l'interaction cacaoyer-*Moniliophthora pernicioso*. Les 6 ans passés en expatriation au Brésil (2002-2008) dans le cadre de la collaboration Cirad-UESC m'ont permis d'acquérir une bonne connaissance du cacaoyer, à la fois sur le terrain et en laboratoire, et de développer des partenariats locaux (UESC, CEPLAC, UNESP, UEFS) solides et productifs en terme de résultats, de publications et d'encadrement d'étudiants. Le renouvellement de ce contrat d'expatriation pour 4 ans (2008-2012) me permet d'envisager une continuation de mes travaux sur la base de ces mêmes partenariats et en interaction avec des étudiants de doctorats sous ma responsabilité ou en co-encadrement. La structure des laboratoires de l'UESC et de la CEPLAC s'est nettement améliorée au cours des 6 dernières années et permet aujourd'hui de développer des expériences de pointe aussi bien en biologie moléculaire qu'en protéomique. D'autres approches pourront être développées au Cirad-Montpellier ou en collaboration avec d'autres laboratoires français ou internationaux, en fonction du projet envisagé (thème, envergure du projet).

Dans ce contexte, et après recadrage de mes actuels sujets d'études, plusieurs axes de recherche peuvent être envisagés, et l'un ou l'autre d'entre eux effectué dans les 4 prochaines années, en fonction de l'obtention de financements et de collaborations adéquats :

1. L'étude fonctionnelle de gènes candidats pour la résistance du cacaoyer au balai de sorcière. Le point le plus important consiste à identifier le(s) gène(s) du cacaoyer directement impliqué(s) dans le(s) mécanisme(s) de résistance au balai de sorcière. Le gène candidat « idéal » serait un gène différentiellement exprimé entre les conditions de résistance/sensibilité (macroarrays confirmé par qPCR et appuyé par des analyses de biologie des systèmes, voir § 9.2.6.2) et co-localisé avec un des QTLs de résistance au balai

de sorcière. Un tel gène pourrait donc être utilisé dans des approches de transgénèse (e.g. sens) de la tomate afin de mieux comprendre son rôle au cours de l'interaction. La sélection d'un tel gène est en cours et devrait être appuyée par les approches de cartographie initiées par les autres membres de l'équipe Génomique et Sélection aussi bien au Brésil (Cirad-UESC-CEPLAC) qu'à Montpellier. Cette ligne de recherche pourrait être développée au Brésil à l'aide de financements locaux ou internationaux de taille moyenne ;

2. Développement d'une approche de transcriptomique (microarrays) prenant en considération l'ensemble des séquences disponibles dans les banques de données publiées (Argout et al., 2008 ; Gesteira et al., 2007 ; Leal et al., 2007 ; Jones et al., 2002 ; Verica et al., 2004) ou non publiées (banques d'ADNC *full-length* et SSH développées en collaboration avec la CEPLAC à partir de différents génotypes de cacaoyer; voir § 9.2.6.1 et 9.2.7) soit environ 60 400 séquences (à comparer entre elles pour en extraire un unique *unigene*). Cette approche pourra à la fois être utilisée : i) pour des études fonctionnelles plus précises incluant, entre autre, l'étude de l'expression de gènes à partir de différents génotypes inoculés par différentes souches du pathogène ; ii) pour une approche de eQTL (*expression QTL* ; Cookson et al., 2009 ; Kliebenstein, 2009 ; Gilad et al., 2008 ; Hansen et al., 2007) sur les descendants du croisement SCA6 x ISC1 (cette descendance comprenant initialement 237 individus à été multipliée par D. Clément à la CEPLAC et atteint aujourd'hui 1500 individus). Même si l'analyse de eQTL s'applique plus facilement à des plantes comme *Arabidopsis* où il est possible d'obtenir des lignées isogéniques, des études sur des plantes ligneuses ont déjà été initiées (*Eucalyptus*, Kirst et al., 2005 ; *Populus*, Street et al., 2006) et permettent de penser qu'il serait possible de développer une approche similaire pour le cacaoyer à partir de la F2 précédemment citée. Cette approche serait complémentaire de l'approche de cartographie SNPs (projet coordonnée par C. Lanaud, voir § 9.3.). Cette ligne de recherche nécessiterait un important financement (e.g. ANR) et une collaboration avec une plateforme de transcriptomique en France ou à l'étranger ;
3. Développement d'une approche de protéomique de l'interaction cacaoyer-*M. pernicios*a parallèle à l'approche de transcriptomique. L'intégration de données par les différents abordages OMICS a un rôle important pour la compréhension d'un système biologique (e.g. pathosystème cacaoyer-*M. pernicios*a). La détermination de corrélations gène-protéine-métabolite est cruciale pour l'identification de gènes responsables pour la synthèse de protéines ou de métabolites impliqués dans des voies métaboliques clés, et a déjà été utilisée pour l'étude du développement de plantes comme le lupin ou le peuplier (Tian et al., 2009 ; Kieffer et al., 2009 ; Bylesjö et al., 2009). Les expériences de protéomique pourraient être développées à l'UESC qui vient d'acquérir un spectromètre de masse (*Q-TOF time-of-*

flight, Waters) ou en collaboration avec d'autres centres ou unités (e.g. UMR QualiSud) à partir de financements brésiliens ou internationaux (e.g. Action Incitative 2009 coordonnée par Pierre Marraccini dans le cadre du CIBA¹³, projet déposé).

Il est intéressant de noter que certaines de ces approches, une fois établies et automatisées pourront être appliquées, à plus long terme, à d'autres pathosystèmes (e.g. cacaoyer-*Phytophthora* spp., cacaoyer-*Ceratocystis cacaofunesta*). On peut également noter que ces axes de recherches entrent directement dans le contexte du Consortium International en Biologie Avancée (CIBA). Le CIBA est une initiative Franco-Brésilienne ayant pour objectif de renforcer et pérenniser une synergie scientifique multi-institutionnelle de premier rang au niveau international. En s'appuyant sur le consortium CIBA, Agropolis (France) et l'Embrapa (Brésil) élaborent conjointement des projets scientifiques d'excellence dans le but de rassembler et partager les ressources biologiques, les infrastructures scientifiques de haut niveau et les connaissances dans le domaine de l'agriculture tropicale et méditerranéenne. Un engagement dans le contexte du CIBA en interaction, à la fois avec les équipes de Montpellier et de l'Embrapa, fait partie de mes objectifs.

Mon projet personnel contient également la volonté de développer de plus fortes interactions entre la France et le Brésil en terme de formation d'étudiants et plus particulièrement de Docteurs. Un de mes objectifs serait de favoriser l'échange de doctorants soit sous la forme de stages courts (3-6 mois), soit sous la forme de doctorat « sandwich » en co-tutelle (moitié du doctorat fait en France, moitié au Brésil) institutionnalisés (sur la base d'une convention entre institutions) ou non. Le fait d'être depuis mars 2008 (et pour 2 ans), Vice-Coordinatrice de l'Ecole Doctorale (*Pós-Graduação*) en Génétique et Biologie Moléculaire de l'UESC devrait me permettre d'effectuer un travail dans ce sens et d'essayer d'établir, informellement puis institutionnellement de plus fortes interactions entre l'Ecole Doctorale de l'UESC et des Ecoles Doctorales françaises. Dans ce sens, il est également prévu que le CIBA soit une plateforme favorisant la formation d'étudiants français et brésiliens. Plusieurs projets sont actuellement en cours de préparation ; on peut noter en particulier la création d'un Master en Biotechnologies Végétales coordonné par Pascal Gantet (UMR DAP/UM2) qui devrait prendre effet au second semestre 2009 et favoriser les échanges entre les étudiants des deux pays.

¹³ Consortium International en Biologie Avancée

9.5. REFERENCES

- Aime MC, Phillips-Mora W. 2005. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (*Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia*, 97: 1012-1022.
- Albrecht C, Geurts R, Bisseling T. 1999. Legume nodulation and mycorrhizae formation; two extremes in host specificity meet. *EMBO J.*, 18: 281-288.
- Albuquerque PSB. 2006. Mapas de ligação e Identificação de locos controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicioso* em acessos de cacaueiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia Brasileira. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 133p.
- Alger K, Caldas M. 1993. A decadência da economia cacaueira da Mata Atlântica baiana e as atitudes conservacionistas dos cacaucultores. Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural. Ilhéus/BA. Revista Sober, v. 2.
- Almeida CM. 2001) Ecologia de populações naturais. In: Dias L.A.S. (ed.), Melhoramento genético do cacaueiro. Funape-UFG, Editora Folha de Viçosa Ltda, pp.129-162.
- Alverson WS, Whitlock BA, Nyffeler R, Bayer C, Baum DA. 1999. Phylogeny of the core Malvales: evidence from ndhF sequence data. *American Journal of Botany*, 86: 1474-1486.
- Andebrhan T, Figueira A, Yamada MM, Cascardo J, Furtek DB. 1999. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 167-175.
- Andebrhan T, Furtek DB. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicioso* isolates from different hosts. *Plant Pathology*, 43: 1020-1027.
- Araújo, M. 1997. Conservação da Mata Atlântica na região cacaueira da Bahia. In: V Seminário da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, Anais, União dos Palmares: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, p. 11-16.
- Argout X, Fouet O, Wincker P, Gramacho K, Legavre T, Sabau X, Risterucci AM, Da Silva C, Cascardo J, Allegre M, Kuhn D, Verica JA, Courtois B, Looor RG, Regis B, Sounigo O, Ducamp M, Guiltinan MJ, Ruiz M, Alemanno L, Machado R, Phillips W, Schnell R, Gilmour M, Rosenquist E, Butler D, Maximova S, Lanaud C. 2008. Towards the understanding of the cocoa transcriptome: production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics*, 30:512.
- Bartley BGD. 1986. Cacao, *Theobroma cacao*. FAO Plant Production and Protection Paper, Rome, 70: 25-42.
- Bastos CN. 1990. Epifitologia, hospedeiros e controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) (Stahel) Singer. Boletim Técnico. Ministério da Agricultura. Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, Ilhéus, 168, 21p.
- Bordenave M, Goldberg R. 1993. Purification and characterization of pectin methylesterases from mung bean hypocotyl cell walls. *Phytochem.*, 33 : 999-1003.
- Brown JS, Schnell RJ, Motamayor JC, Lopes U, Kuhn DN, Borrone JW. 2005. Resistance gene mapping for Witches' broom disease in *Theobroma cacao* L. in an F2 population using SSR markers and candidate genes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130: 366-373.
- Bylesjö M, Nilsson R, Srivastava V, Grönlund A, Johansson AI, Jansson S, Karlsson J, Moritz T, Wingsle G, Trygg J. Integrated analysis of transcript, protein and metabolite data to study lignin biosynthesis in hybrid aspen. *J Proteome Res.* 2009 Jan;8(1):199-210.
- Calle H, Cook AA, Fernando SY. 1982. Histology of witchesbroom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*. *Phytopathology*, 72:1479-1481.
- Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB, Alemanno L, Gesteira AS, Micheli F, Mariano AC, Gramacho KP, Silva DC, Meinhardt L, Mazzafera P, Pereira GAG, Cascardo JCM. 2007. Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso*. *Plant Science*, 173: 106-117.
- Cheesman EE. 1944. Notes on the nomenclature, classification and possible relationships of cacao populations. *Tropical Agriculture*, 21: 143-159.
- Chet I, Benhamou N, Haran S. 1998. Mycoparasitism and lytic enzymes. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*, Vol. 2 (Harman, G.E. and Kubicek, C.P., eds), pp. 153–171. London: Taylor and Francis
- Clément D, Lanaud C, Sabau X, Fouet O, Le Cunff L, Ruiz E, Risterucci AM, Glaszmann JC, Piffanelli P. 2004. Creation of BAC genomic resources for cocoa (*Theobroma cacao* L.) for physical mapping of RGA containing BAC clones. *Theor Appl Genet.* 108: 1627-34.

- Clement D, Risterucci AM, Motamayor JC, N'Goran J, Lanaud C. 2003. Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome*, 46: 204-12.
- Clement D, Risterucci AM, Motamayor JC, N'Goran J, Lanaud C. 2003. Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome*, 46: 103-11.
- Cookson W, Liang L, Abecasis G, Moffatt M, Lathrop M. 2009. Mapping complex disease traits with global gene expression. *Nat Rev Genet.*, 10: 184-94.
- Crouzillat D, Lerceteau E, Petiard V, Morera J, Rodriguez H, Walter D, Phillips W, Ronning C, Schnell R, Osei J, Fritz P. 1996. *Theobroma cacao* L.: a genetic linkage map and quantitative trait loci analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 205-214.
- Crouzillat D, Menard B, Mora A, Phillips W, Petiard V. 2000a. Quantitative trait analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers—Yield QTL detection and stability over 15 years. *Euphytica*, 114: 13–23.
- Crouzillat D, Phillips W, Fritz PJ, Petiard V. 2000. Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. Polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in cacao. *Euphytica*, 114: 25-36.
- Cuatrecasas J. 1964. Cacao and its allies a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions from the United States National herbarium, Washington, 6: 379 - 614.
- Dawes NL and Glassey J. 2007. Normalisation of multicondition cDNA macroarray data. *Comparative and Functional Genomics*, doi:10.1155/2007/90578.
- De Arruda MC, Ferreira MA, Miller RN, Resende ML, Felipe MS. 2003a Nuclear and mitochondrial rDNA variability in *Crinipellis pernicioso* from different geographic origins and hosts. *Mycological Research*, 107: 25-37.
- De Arruda MCC, Miller RNG, Ferreira MASV, Felipe MSS. 2003b. Comparison of *Crinipellis pernicioso* isolates from Brazil by ERIC repetitive element sequence-based PCR genomic fingerprinting. *Plant Pathology*, 52 : 236-244.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS*, 95: 14863-14868.
- Faleiro FG, Santos IS, Bahia RCS, Santos RF, Yamada MM, Anherth D. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica*, 2: 31-34.
- FaleiroFG, Queiroz VT, Lopes UV, Guimaraes CT, Pires JL, Yamada MM, Araujo IS, Pereira MG, Schnell R, de Souza Filho GA, Ferreira CF, Barros EG, Moreira MA. 2006. Mapping QTLs for Witches' Broom (*Crinipellis pernicioso*) Resistance in cacao (*Theobroma cacao* L.). *Euphytica*, 149: 227-235.
- FAO. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT <http://faostat.fao.org/site/570/DesktopDefault.aspx?PageID=570#ancor>
- Figueira A, Janick J, BeMiller JN. 1994. Partial characterization of cacao pod and stem gums. *Carbohydr. Polym.*, 24:133-138.
- Figueira AVO, Janick J, Goldsbrough P. 1992. Genome size and DNA polymorphism in *Theobroma cacao*. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 117: 673-677.
- Filho DF, Pungartnik C, Cascardo JC, Brendel M. 2006. Broken hyphae of the basidiomycete *Crinipellis pernicioso* allow quantitative assay of toxicity. *Curr Microbiol.*, 52: 407-412.
- Flament MH, Kebe I, Clément D, Pieretti I, Risterucci AM, N'Goran JA, Cilas C, Despréaux D, Lanaud C. 2001. Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome*, 44: 79-85.
- Formighieri EF, Tiburcio RA, Armas ED, Medrano FJ, Shimo H, Carels N, Góes-Neto A, Cotomacci C, Carazzolle MF, Sardinha-Pinto N, Rincones J, Digiampietri L, Carraro DM, Azeredo-Espin AM, Reis SF, Deckmann AC, Gramacho K, Gonçalves MS, Moura Neto JP, Barbosa LV, Meinhardt LW, Cascardo JCM, Pereira GAG. 2008. The mitochondrial genome of the phytopathogenic basidiomycete *Moniliophthora pernicioso* is 109 kb in size and contains a stable integrated plasmid. *Mycol Res*, 112:1136-1152.
- Garcia O, Macêdo J, Tiburcio R, Zapparoli G, Rincones J, Bittencourt L, Ceita G, Micheli F, Gesteira A, Mariano A, Schiavinato M, Medrano FJ, Meinhardt L, Pereira G, Cascardo J. 2007. Characterization of necrosis and ethylene inducing proteins (NEP) in the hemibiotrophic basidiomycete *Moniliophthora pernicioso* the causal agent of the witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycological Research*, 111: 443-455.
- Gesteira AS, Micheli F, Carels N, Da Silva AC, Gramacho KP, Schuster I, Macêdo JN, Pereira GAG, Cascardo JCM. 2007. Comparative analysis of expressed genes from cacao meristems infected by *Moniliophthora pernicioso*. *Annals of Botany*, 100: 129-140.

- Gesteira AS, Micheli F, Ferreira CF, Cascardo JCM. 2003. Isolation and purification of functional total RNA from different organs of cocoa tree during its interaction with the pathogen *Crinipellis perniciosus*. *BioTechniques*, 35: 494-500.
- Gilad Y, Rifkin SA, Pritchard JK. 2008. Revealing the architecture of gene regulation: the promise of eQTL studies. *Trends Genet.*, 24: 408-15.
- Godiard L, Niebel A, Micheli F, Gouzy J, Ott T, Gamas P. 2007. Identification of new potential regulators of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis using a large scale Suppression Subtractive Hybridization approach. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 20: 331-332.
- Gomes DS. 2009. Análise molecular e bioquímica do metabolismo da quitina em *Moniliophthora perniciosus*. Dissertação de Genética e Biologie Moléculaire da UESC.
- Gomes LMC Melo GRP, Faleiro FG, Silva SDVM, Araujo IS, Bahia RC, Moraes MG, Ahnert D. 2000. Diversidade genética de *Crinipellis perniciosus* na região sul da Bahia utilizando marcadores moleculares RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 25: 377.
- Gramacho KP, Bezerra JL, Bahia RC, Mahe L, Sena K. 2002. Caracterização molecular (RAPD, rDNA) e patôgenica de isolados de *Crinipellis perniciosus* em cacauzeiro e outros hospedeiros. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 290.
- Gramacho KP, Lima LS, Moreira RFC, Serra W, Lima LS, Braz NG. 2006. Proposta para estabelecimento de diferenciadores para estudo da evolução do *Crinipellis perniciosus*. In: XXXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Salvador, *Fitopatologia Brasileira*, 31: 214.
- Gramacho KP, Risterucci AM, Lanaud C, Lima LS, Lopes UV. 2007. Characterization of microsatellites in the fungal plant pathogen *Crinipellis perniciosus*. *Molecular Ecology Notes*, 7: 153-155.
- Griffith GW, Hedger JN. 1994. The breeding biology of biotypes of the witches' broom pathogen of cocoa, *Crinipellis perniciosus*. *Heredity*, 72: 278-289.
- Hansen BG, Halkier BA, Kliebenstein DJ. 2008. Identifying the molecular basis of QTLs: eQTLs add a new dimension. *Trends Plant Sci.*, 13:72-77.
- Hartmann T, Sanches A. 2005. Produtor de cacau perde rentabilidade e dívidas aumentam. *Comissão Nacional do Cacau da CAN*. N°209 (Agosto).
- Herron SR, Benen JAE, Scavetta RD, Visser J and Jurnak F. 2000. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. *PNAS*, 16 : 8762-8769.
- Holliday P. 1952. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). London: Her Majesty's Stationery Office, 8 p.
- Hora Junior BT, Micheli F, Lopes MA, Dias CV, Gramacho KP, Sabau X, Mauro SMZ, Cascardo JCM, Gesteira AS. Large scale expression analysis of cacao-*Moniliophthora perniciosus* interaction. *Soumis à Annals of Botany*.
- Howell CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87, 4-10.
- Jones PG, Allaway D, Gilmour DM, Harris C, Rankin D, Retzel ER, Jones CA. 2002. Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. *Planta*, 216: 255-264.
- Journet E-P, van Tuinen D, Gouzy J, Crespeau H, Carreau V, Farmer M-J, Niebel A, Schiex T, Jaillon O, Chatagnier O, Godiard L, Micheli F, Kahn D, Gianinazzi-Pearson V, Gamas P. 2002. Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research*, 30: 5579-5592.
- Kieffer P, Planchon S, Oufir M, Ziebel J, Dommes J, Hoffmann L, Hausman JF, Renaut J. Combining proteomics and metabolite analyses to unravel cadmium stress-response in poplar leaves. *J Proteome Res.* 2009 Jan;8(1):400-17.
- Kilaru A, Hasenstein KH. 2005. Development and pathogenicity of the fungus *Crinipellis perniciosus* on interaction with cacao leaves, *Phytopathology*, 95 : 101-107.
- Kirst M, Basten CJ, Myburg AA, Zeng ZB, Sederoff RR. 2005. Genetic architecture of transcript-level variation in differentiating xylem of a eucalyptus hybrid. *Genetics*, 169: 2295-303.
- Kliebenstein D. 2009. Quantitative Genomics: Analyzing Intraspecific Variation Using Global Gene Expression Polymorphisms or eQTLs. *Annu Rev Plant Biol.*, 60: 93-114.
- Kochhar S, Gartenmann K, Guilloteau M, McCarthy J. 2001. Isolation and characterization of 2S cocoa seed albumin storage polypeptide and the corresponding cDNA. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4470-4477.
- Laloi M, McCarthy J, Morandi O, Gysler C, Bucheli P. 2002. Molecular and biochemical characterisation of two aspartic proteinases TcAP1 and TcAP2 from *Theobroma cacao* seeds. *Planta*, 215:754-762.
- Lanaud C, Risterucci AM, N'Goran JAK, Clement D, Flament MH, Laurent V, Falque M. 1995. A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *TAG*, 91: 987-993.

- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti I, N’Goran JAK, Fargeas D. 2004. Characterization and genetic mapping of resistance and defense gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Molecular Breeding*, 13: 211 - 227.
- Lauria CA, Rocha NA, Pacheco CT, Araújo HC, Souza MA, Corrêa PRM, Ferry RV, Branco TCV, Filho VLS, Soares WL. 2002. Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. In: Institut Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (ed.), Levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA). *Levant. Sistem. Prod. Agríc. Rio de Janeiro*, 12: 1-79.
- Leal GA, Albuquerque PSB, Figueira A. 2007. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches’ broom disease caused by *Crinipellis pernicioso*. *Molecular Plant Pathology*, 8: 279-292.
- Lima LS, Gramacho KP, Gesteira AS, Lopes UV, Gaiotto FA, Zaidan HA, Pires JL, Cascardo JCM, Micheli F. 2008. Characterization of microsatellites from cacao-*Moniliophthora pernicioso* interaction expressed sequence tags. *Molecular Breeding*, 22: 315-318.
- Lopes M. 2005. Estudo molecular de quitinasas de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. Dissertação da UESC.
- Lopes MA, Gomes DS, Koblitz MGB, Pirovani CP, Cascardo JCM, Góes-Neto A, Micheli F. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*. *Mycological Research*, 112: 399-406
- Lopez F, Rougemont J, Loriod B, Bourgeois A, Loï L, Bertucci F, Hingamp P, Houlgatte R, Granjeaud S. 2004. Feature extraction and signal processing for nylon DNA Microarrays. *BMC Genomics*, 5: 38
- Marita JM, Nienhuis J, Pires JL, Aitken WM. 2001. Analysis of genetic diversity in *Theobroma cacao* with emphasis on witches’ broom disease resistance. *Crop Science*, 41: 1305-1316.
- Maximova S, Miller C, Antúnez de Mayolo G, Pishak S, Young A, Guiltinan MJ. 2003 Stable transformation of *Theobroma cacao* L. and influence of matrix attachment regions on GFP expression. *Plant Cell Rep.*, 21: 872-83.
- Maximova SN, Marelli JP, Young A, Pishak S, Verica JA, Guiltinan MJ. 2006 Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta*, 224: 740-9.
- Meinhardt LW, Bellato M, Rincones J, Azevedo RA, Cascardo JC, Pereira GA. 2006. In vitro production of biotrophic-like cultures of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches’ broom disease of *Theobroma cacao*. *Current Microbiology*, 52: 191-196.
- Meinhardt LW, Rincones J, Bailey BA, Aime MC, Griffith GW, Zhang D, Pereira GA. 2008. *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cacao: what's new from this old foe? *Mol Plant Pathol.*, 9: 577-88.
- Micheli F, Holliger C, Goldberg R, Richard L. 1998. Characterisation of the pectin methylesterase-like gene AtPME3: a new member of a gene family comprising at least twelve genes in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 220: 13-20.
- Micheli F, Sundberg B, Goldberg R, Richard L. 2000. Radial distribution pattern of pectin methylesterases across the cambial region of hybrid aspen at activity and dormancy. *Plant Physiology*, 124: 191-199.
- Micheli F. 2001. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6 : 414-419.
- Mondego JM, Carazzolle MF, Costa GG, Formighieri EF, Parizzi LP, Rincones J, Cotomacci C, Carraro DM, Cunha AF, Carrer H, Vidal RO, Estrela RC, García O, Thomazella DP, de Oliveira BV, Pires AB, Rio MC, Araújo MR, de Moraes MH, Castro LA, Gramacho KP, Gonçalves MS, Neto JP, Neto AG, Barbosa LV, Guiltinan MJ, Bailey BA, Meinhardt LW, Cascardo JC, Pereira GA. 2008. A genome survey of *Moniliophthora pernicioso* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics*, 9:548.
- Mota JWS. 2003. Análise da diversidade genética de germoplasma de *Theobroma cacao* L. da Amazônia Brasileira por microssatélites. Tese de Doutorado em Fisiologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.
- Motamayor JC, Lachenaud P, da Silva E Mota JW, Llor R, Kuhn DN, Brown JS, Schnell RJ. 2008. Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10): e3311. doi:10.1371/journal.pone.0003311.
- Nelson RR. 1978. Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 16: 359-378.
- Niella G et al. 1999 Aperfeiçoamento da metodologia de produção artificial de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira*, 24: 523-527.

- Niella GR, Resende ML, Castro HA, Figueira AR, Silva IS, Araujo LM, Gomes LMC, Faleiro FG. 2000. Diversidade genética de isolados monospóricos de *Crinipellis pernicioso* provenientes de diferentes estados do Brasil utilizando marcadores moleculares RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, 25: 400.
- Orchard J, Collin HA, Hardwick K, Isaac S. 1994. Changes in morphology and measurement of cytokinin levels during the development of witches-brooms on cocoa. *Plant Pathology*, 43: 65-72.
- Parlevliet JE, Zadoks JC. 1977. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. *Euphytica*, 26: 5 - 21.
- Pereira JL, A. Ram, J.M. Figueiredo, and L.C. Almeida. 1989. Primeira ocorrência de vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. *Agrotropica*, 1: 79-81.
- Pires JL, Faleiro FG, Yamada MM, Lopes UV, Bahia RCS, Faleiro ASG, Santos RC. 2001. Variabilidade genética de fontes de resistência de *Theobroma cacao* a *Crinipellis pernicioso* com base em marcadores microssatélites. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 347.
- Pires JL. 2003. Avaliação quantitativa e molecular de germoplasma para o melhoramento do cacaueiro com ênfase na produtividade, qualidade de frutos e resistência a doenças. Tese de Doutorado, UFV.
- Pirovani CP, Carvalho HAS, Machado R, Gomes DS, Alvim FC, Pomella AWV, Gramacho K, Cascardo JCM, Pereira G, Micheli F. 2001. Protein extraction for proteome analysis from cacao leaves and meristems, organs infected by *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of the witches' broom disease. *Electrophoresis*, 29: 2391-2401.
- Ploetz RC, Schnell RJ, Ying Z, Zheng Q, Olano CT, Motamayor JC, Johnson ES. 2005. Analysis of molecular diversity in *Crinipellis pernicioso* with AFLP markers. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 317-326.
- Pound FJ. 1943. Cacao and Witches' broom disease (*Maramius pernicioso*). In: Toxopeus H. Reprint Archives of Cocoa Research, American Cocoa Research Institute, USA, 1: 43.
- Pressey R. Role of pectinesterase in pH-dependent interactions between pea cell wall polymers. 1984. *Plant Physiol.*, 76: 547-549.
- Pugh T, Fouet O, Risterucci AM, Brottier P, Abouladze M, Deletrez C, Courtois B, Clement D, Larmande P, N'Goran JA, Lanaud C. 2004. A new cacao linkage map based on codominant markers: development and integration of 201 new microsatellite markers. *Theor Appl Genet.*, 108: 1151-61.
- Pungartnik C, Silva AC, Melo SA, Gramacho K, Cascardo JCM, Brendel M, Micheli F, Gesteira AS. 2009. High-affinity copper transport and Snq2 export permease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* modulate cytotoxicity of PR-10 from *Theobroma cacao*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 22: 39-51.
- Purdy et al. 1997. An automated system for screening *Theobroma cacao* for resistance to witches' broom. *Agrotropica*, 9: 119-126.
- Purdy LH, Schmidt RA. 1996. Status of cocoa witches broom: biology, epidemiology, and management. *Annual Review of Phytopathology*, 34: 573-594.
- Queiroz VT, Guimaraes CT, Anherth D, Schuster I, Daher RT, Pereira MG, Miranda VRM, Loguercio LL, Barros EG, Moreira MA. 2003. Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches' broom disease. *Plant Breeding*, 122: 268 - 272.
- Redgwell RJ, Hansen CE. 2000. Isolation and characterisation of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Planta*, 210: 823-830.
- Rincones J, Mazotti GD, Griffith GW, Pomela A, Figueira A, Leal GA, Jr., Queiroz MV, Pereira JF, Azevedo RA, Pereira GA, Meinhardt LW. 2006. Genetic variability and chromosome-length polymorphisms of the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso* from various plant hosts in South America. *Mycol Res*, 110: 821-832.
- Rincones J, Meinhardt LW, Vidal BC, Pereira GA. 2003. Electrophoretic karyotype analysis of *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of *Theobroma cacao*. *Mycol Res*, 107: 452-458.
- Rincones J, Scarpari LM, Carazzolle MF, Mondego JM, Formighieri EF, Barau JG, Costa GG, Carraro DM, Brentani HP, Vilas-Boas LA, de Oliveira BV, Sabha M, Dias R, Cascardo JM, Azevedo RA, Meinhardt LW, Pereira GA. 2008. Differential gene expression between the biotrophic-like and saprotrophic mycelia of the witches' broom pathogen *Moniliophthora pernicioso*. *Mol Plant Microbe Interact.*, 21: 891-908.
- Rio MC, de Oliveira BV, de Tomazella DP, Silva JA, Pereira GA. 2008. Production of calcium oxalate crystals by the basidiomycete *Moniliophthora pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of Cacao. *Curr Microbiol.*, 56: 363-70.
- Rios-Ruiz RA. 2001. Melhoramento para resistência a doenças. In: Dias L.A.S. (ed.), Melhoramento genético do cacaueiro. Funape-UFG, Editora Folha de Viçosa Ltda, pp. 289-324.
- Risterucci AM, Paulin D, N'Goran JAK, Ducamp M, Lanaud C. 2000. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for resistance to *Phytophthora* in *Theobroma cacao* L. *INGENIC Newsletter*, 5: 9-10.

- Robinson RA. 1978. La “Escoba de Bruja”, Enfermedad del cacao en Ecuador. In: Informe FAOSTAT Agriculture Data.
- Rocha HM, Miranda RAC, Sgrillo RB, Setubal RA. 1993. Witches’ broom in Bahia, Brazil. In: Rudgard SA, Madison AC, Andebrhan T, eds. Disease and management in cocoa: comparative epidemiology of witches’ broom. London: Chapman and Hall, p.189-200.
- Rosário M et al. 1978. Cacao: história e evolução no mundo. Ilhéus: CEPLAC, 46 p.
- Rudgard SA, Butler DR. 1987. Witches’ broom disease in Rondonia, Brazil: pod infection in relation to pod susceptibility, wetness, inoculum, and phytosanitation. *Plant Pathol.*, 36: 515–522.
- Samuels GJ, Pardo-Schultheiss R, Hebbar PK, Lumsden RD, Bastos CN, Costa JC, Bezerra JL. 2000. *Trichoderma stromaticum*, sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.*, 104, 760–764.
- Santos RC, Pires JL, Lopes UV, Gramacho KP, Flores AB, Bahia RCS, Ramos HCC, Corrêa RX, Ahnert D. 2005. Assessment of genetic diversity on a sample of cocoa accessions resistant to Witches’ broom disease based on RAPD and pedigree data. *Bragantia*, 64: 361-368.
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AW, Schiavinato MA, Cascardo JCM, Pereira GAG. 2005. Biochemical changes during the development of witches’ broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis perniciosa*. *Journal of Experimental Botany*, 56: 865-877.
- Schultz DJ, Craig R, Cox-Foster DL, Mumma RO, Medford JL. 1994. RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12: 310-316.
- Schultze M, Kondorosi A. 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet.*, 32: 33-57.
- Shaw MW, Vandenbon AE. 2006. A qualitative host-pathogen interaction in the *Theobroma cacao*-*Moniliophthora perniciosa* pathosystem. *Plant Pathology*, Doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01549.x
- Siedlecka A, Wiklund S, Peronne A-M, Micheli F, Les’niewska J, Sethson I, Edlund U, Richard L, Sundberg B, Mellerowicz E. Pectin methyl esterase inhibits intrusive and symplastic cell growth in developing wood cells of *Populus*. *Plant Physiology*, 146: 554-565
- Silva FCO, Neto EF, Kodama KR, Figueira A. Avaliação das relações genéticas entre genótipos de cacauero (*Theobroma cacao* L.) contrastantes para reação à vassoura-de-bruxa através de marcadores RAPD. *Genetics and Molecular Biology*, 21: 205.
- Silva SDVM, Luz EDMN, Almeida OC. 2002. Redescritção da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciosa* em cacauero. *Agrotrópica*, 14: 1-24.
- Silva SDVM, Matsuoka K. 1999. Histologia da interação *Crinipellis perniciosa* em cacaueros suscetível e resistente à vassoura-de-bruxa. *Fitopatologia brasileira*, 24: 54-59.
- Souza CASS, Dias LAS. 2001. Melhoramento ambiental e sócio-economia. In: Dias LAS (Ed.) Melhoramento genético do cacauero, Viçosa, Funape, UFG, cap1, p.147.
- Sreenivasan TN, Dabydeen S. 1989. Modes of Penetration of Young Cocoa Leaves by *Crinipellis perniciosa*. *Plant Disease*, 73: 478-481.
- Street NR, Skogstrom O, Sjodin A, Tucker J, Rodriguez-Acosta M, Nilsson P, Jansson S, Taylor G. 2006. The genetics and genomics of the drought response in *Populus*. *The Plant Journal*, 48: 321–341
- Tian L, Peel GJ, Lei Z, Aziz N, Dai X, He J, Watson B, Zhao PX, Sumner LW, Dixon RA. Transcript and proteomic analysis of developing white lupin (*Lupinus albus* L.) roots. *BMC Plant Biol.* 2009 Jan 5;9:1.
- Trevizan SDP, da Silva JR MF. 1995. Impactos sociais, econômicos e ambientais relacionados a vassoura-de-bruxa. Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural, 33. Curitiba, PR: Anais p. 1409.
- Vello F, Garcia JR. 1971. Características das principais variedades de cacau cultivadas na Bahia. *Revista Theobroma*, 1: 3-10.
- Verica JA, Maximova SN, Strem MD, Carlson JE, Bailey BA, Guiltinan MJ. 2004. Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Reporter*, 23: 404-413.
- Wang E. 2005. RNA amplification for successful gene profiling analysis. *Journal of Translational Medicine*, 3: 28.
- Wheeler BEJ, MEPSTED R. 1988. Pathogenic variability among isolates of *Crinipellis perniciosa* from cocoa (*Theobroma cacao*). *Plant Pathology*, 30: 347-488.
- Woodrow L, Jiao J, Tsujita MJ, Grodzinski B, 1989. Whole plant and leaf steady state gas exchange during ethylene exposure in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiology*, 90: 85–90.
- Yamada MM, Faleiro FG, Lopes UV, Bahia RC, Pires JL, Gomes LMC, Melo GRP. 2001. Genetic variability in cultivated cacao populations in Bahia, Brazil detected by isozymes and RAPD markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 1: 377-384.

Yamada MM, Lopes UV. 1999. Paternity analysis of cacao trees selected for resistance to witches' broom in plantations of Bahia, Brazil. *Agrotrópica*, 11: 83-88.

10. TABLEAU RECAPITULATIF DES PUBLICATIONS

Auteur	Année	Revue	Référence	Facteur d'impact	Numéro DOI (http://dx.doi.org/)
Pungartnik et al. ^a	2009	<i>Molecular Plant Microbe Interactions</i>	22: 39-51	4,275	10.1094/MPMI-22-1-0039
Lima et al. ^{a,b}	2008	<i>Molecular Breeding</i>	22: 315-318	2,357	10.1007/s11032-008-9174-6
Pirovani et al. ^{a,b}	2008	<i>Electrophoresis</i>	29: 2391-2401	3,609	10.1002/elps.200700743
Siedlecka et al.	2008	<i>Plant Physiology</i>	146: 554-565	6,367	10.1104/pp.107.111963
Lopes et al. ^{a,b}	2008	<i>Mycological Research</i>	112: 399-406	1,861	10.1016/j.mycres.2007.10.017
Ceita et al.	2007	<i>Plant Science</i>	173:106-117	1,795	10.1016/j.plantsci.2007.04.006
Gesteira A, Micheli F et al. ^{a,c}	2007	<i>Annals of Botany</i>	100 :129-140	2,939	10.1093/aob/mcm092
Garcia et al.	2007	<i>Mycological Research</i>	111:443-455	1,861	10.1016/j.mycres.2007.01.017
Godiard et al.	2007	<i>Molecular Plant Microbe Interactions</i>	20: 331-332	4,275	10.1094/MPMI-20-3-0321
Gesteira et al. ^a	2003	<i>BioTechniques</i>	35: 494-500	2,759	-
Journet et al.	2002	<i>Nucleic Acids Research</i>	30: 5579-5592	6,954	-
Micheli ^a	2001	<i>Trends in Plant Science</i>	6 : 414-419	8,995	10.1016/S1360-1385(01)02045-3
Micheli et al. ^a	2000	<i>Plant Physiology</i>	124: 191-199	6,367	-
Micheli et al.	1998	<i>Gene</i>	220: 13-20	2,871	10.1016/S0378-1119(98)00431-4

^a Auteur pour correspondance

^b Publication impliquant un étudiant de Master ou de Thèse

^c Premiers auteurs joints

Indice H¹⁴: 7

¹⁴ D'après scHolar index: <http://www-ihm.lri.fr/~roussel/moulinette/h/h.cgi>



UNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11



ÉCOLE DOCTORALE "SCIENCES DU VÉGÉTAL DU GENE A L'ECOSYSTEME 145

Rapport de Michel Dron, Professeur de Biologie-Pathologie Végétales à l'Université Paris sud 11-Orsay, concernant la candidature HDR de Mme Fabienne Micheli auprès de l'Université Paris sud 11-Orsay

Mme Fabienne Micheli, 35 ans, a obtenu son DEA PCMP (P6 ; Psud 11, INA-PG) en 1997, DEA suivi d'un Doctorat à Paris 6 en 2000, de deux stages postdoctoraux, l'un en continuation de la thèse à Paris jusqu'en 2001 puis l'autre à Toulouse 2001-2002, puis d'une intégration au Cirad en 2002 avec directement affectation à l'UESC à Ilheus au Brésil (Etat de Bahia, Nordeste), où elle est en affectation au moins jusqu'en 2012.

Après avoir fait la totalité de ses études universitaires auprès de l'Université Paris 6, elle a réalisé son stage de DEA et sa thèse auprès de Mme Goldberg, Paris 6-INA-PG sur « l'étude moléculaire et biochimique des pectine méthylestérases dans la différenciation cambiale chez le peuplier ». Son deuxième stage postdoctoral au LIPM INRA-CNRS Toulouse, réalisé avec Pascal Gamas, concernait « l'étude du programme symbiotique précoce de *Medicago truncatula* par génomique fonctionnelle ».

Au cours de ces 6 années de formation 1997-2002, en France, Fabienne Micheli a acquis une grande quantité de technologie en Biologie Moléculaire, Biochimie et approches génomiques dont on verra qu'elles l'ont guidées dans le développement du sujet qu'elle a pris puis maîtrisé à Ilheus avec ses collègues brésiliens. Pendant cette période 3^{ème} cycle et postdoctorale française, Fabienne Micheli a publié 5 articles dans des revues internationales à FI, 3 relatives à son doctorat et 2 à son second postdoc, 3 en 1^{ère} auteure et 2 en co-auteure. Je souhaite souligner son initiative, liée à sa thèse de publication d'une revue sur les Pectine Méthyl Estérases, pour laquelle elle est seule auteure, et ce dans l'une des meilleures revues de synthèse dans le domaine des Plantes, Trends in Plant Sciences.

Depuis son recrutement au Cirad et son affectation à l'UESC Ilheus en 2002, Fabienne Micheli n'a pas chômé. Elle s'est tout d'abord appropriée un nouveau sujet, concernant un considérable problème phytosanitaire du cacao au Brésil, dû à un champignon basidiomycète, *Moniliophthora perniciosa*, responsable de la maladie dite du balai de sorcière. Son implication y a été de plusieurs ordres. Elle a contribué au développement de cette équipe spécialisée sur l'étude des interactions Cacao-*Moniliophthora*

Pr Michel DRON

Université Paris 11 -Institut de Biotechnologie des Plantes, Bât. 630, 91405 ORSAY Cedex,

Tél : 01 69 15 33 10 - E-mail : michel.dron@u-psud.fr

Secrétariat : Maryelle Fradin, Tél : 01 69 15 33 05, Fax : 01 69 15 34 24, E-mail : ecodoc.sdv@ u-psud.fr

<http://www.ibp.u-psud.fr/EcoleDoc/index.html>



UNIVERSITÉ
PARIS-SUD 11



ÉCOLE DOCTORALE "SCIENCES DU VÉGÉTAL DU GÈNE À L'ÉCOSYSTÈME 145"

perniciosa, au niveau moléculaire et biochimique au niveau des 2 partenaires, équipe qui a maintenant atteint un leadership mondial sur cette interaction avec des publications dans des revues à Haut facteur

d'Impact (BMC, MPMI...) démontrant l'acquisition d'une dimension internationale de l'ensemble du groupe et notamment de Fabienne Micheli. Les contributions de Fabienne Micheli concernent plus particulièrement les approches génomiques chez le cacao et biochimiques chez *M. perniciosa*. Néanmoins, Fabienne Micheli démontre sa connaissance de l'ensemble des travaux conduits sur ce pathosystème. Elle a été amenée à développer de nouvelles méthodologies pour faire face aux difficultés rencontrées avec le matériel cacaoyer et ce qui est remarquable c'est qu'elle a une politique de publication sur ce tout ce qu'elle réalise.

Au niveau des autres responsabilités maîtrisées d'un candidat HDR, nous sommes dans une situation presque idéale, puisque Fabienne Micheli co-dirige une jeune Ecole Doctorale à Ilheus, une Ecole Doctorale dont elle décrit les fonctions et qui dans son organisation et ses attributs n'est pas si éloignée des Ecoles Doctorales que nous connaissons en France. Par ailleurs, elle a encadré plusieurs stages longs de Maestrado (anciennes thèses 3^{ème} cycle françaises et a participé à l'encadrement de plusieurs doctorants. Elle a plusieurs publications en situation d'encadrement dans des revues à comité de lecture international. Elle totalise 9 publications « brésiliennes » dans des revues internationales à comité de lecture, dont 3 en position de dernière auteure encadrante, 1 en première auteure et le tout dans des revues à très bon facteur d'impact.

Par ailleurs, depuis 2004, elle assure une grande partie du financement de son équipe, d'implique dans l'enseignement et la formation. Bien sûr, elle réalise tout cela en portugais-brésilien.

En conclusion c'est un parfait dossier de candidature HDR, une étoffe internationale en Pathologie végétale moléculaire, la responsabilité d'un laboratoire, une activité solide dans un Institut compétitif, de l'encadrement, du succès dans le financement, des responsabilités collectives au niveau de l'Ecole doctorale. Je donne un avis extrêmement favorable à la soutenance de l'HDR de Fabienne Micheli devant le jury mis en place par l'Université Paris sud 11-Orsay.

A Orsay, le 31 Mars 2009-03-31

Michel Dron.

Dr. Pierre Marraccini
Cirad UMR 1098 -DAP
EMBRAPA -Cenargen
Centre des Ressources Génétiques et Biotechnologie
Parque Estação Biologia
70770-900 Brasilia DF
Brésil
E-mail: pierrem@cenargen.embrapa.br et marraccini@cirad.fr
Tel: +55 61 3448 4795

Brasilia, le 17 mars 2009

**Rapport sur la demande d'Habilitation à Diriger des Recherches (Université de Paris XI)
présentée par Madame Fabienne Micheli, chercheur au Cirad dans l'UMR DAP -
Développement et Amélioration des Plantes.**

Fabienne Micheli est âgée de 35 ans et a effectué la totalité de ses études universitaires à l'Université de Paris 6 où elle a obtenu un diplôme de DEA de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes en 1997 puis le titre de docteur en biologie en 2001. Ce travail de thèse, réalisé sous la direction du Pr. Renée Goldberg (Institut J. Monod, Paris), a porté sur l'étude des pectines méthylestérases dans l'élaboration des tissus conducteurs (xylème et phloème) chez le peuplier (*Populus*) par des approches biochimiques et moléculaires. A l'issue de son doctorat obtenu avec la mention très honorable, Madame Fabienne Micheli a effectué un stage postdoctoral d'un an dans le laboratoire du Dr. P. Gamas (INRA Toulouse) pour étudier les mécanismes impliqués dans la perception et la transduction du signal conduisant à la formation des nodosités dans le modèle d'interaction plante-microorganisme *Rhizobium meliloti* – *Medicago truncatula*, par des approches de génomique. Recrutée au Cirad en 2002, M. Micheli occupe un poste de chercheur à l'UMR DAP (Développement et Amélioration des plantes, groupe Génome et sélection) et est expatriée au Brésil dans le cadre d'un accord de coopération scientifique entre le Cirad et l'Université Estadual de Santa Cruz (UESC) localisée à Ilhéus dans l'état de Bahia. Son sujet de recherche actuel porte sur l'étude des interactions du pathogène *Moniliophthora perniciosa* avec *Theobroma cacao*.

Le document servant de support à la soutenance de l'Habilitation à Diriger des Recherches de M. Micheli est construit sur le modèle habituel et contient une partie consacrée à la description de son parcours scientifique, de ses activités d'enseignement et de formation à la recherche d'étudiants. Dans une deuxième partie, M. Micheli a choisi de focaliser son document sur la description des recherches qu'elle mène actuellement à l'UESC sur l'étude de l'interaction *Moniliophthora perniciosa* - *Theobroma cacao*. Le projet de recherche présenté en fin du document constitue la dernière partie du manuscrit présenté par M. F. Micheli.

Au cours de sa carrière, M. Micheli a été amenée à travailler dans plusieurs laboratoires, sur différents modèles biologiques (*Arabidopsis thaliana*, *Populus tremula*, *Medicago truncatula* et *Theobroma cacao*) et en utilisant différentes approches méthodologiques (biologie moléculaire, biochimie et protéomique) pour développer ses projets de recherche qui portaient essentiellement sur la compréhension des interactions plante-microorganismes. Cette thématique de recherche constitue maintenant le fondement de sa carrière scientifique qui a donné lieu à la publication de 17 articles (parus, acceptés ou soumis) en 11 ans dont 3 en premier auteur (travail de thèse) et 2 comme auteur pour la correspondance. Plusieurs articles sont en actuellement en préparation pour l'année 2009. Par ailleurs, les travaux développés par M. Micheli ont conduit à de nombreuses communications (orales ou posters) à des congrès nationaux et internationaux (82) dont 53 sont liées au projet de recherche portant sur l'étude de l'interaction *Moniliophthora perniciosa* - *Theobroma cacao*. Au cours de ces 6 dernières années, il est également à noter que M. Micheli a été examinatrice de plusieurs articles pour

des revues de rang A de très bon facteur d'impact (comme par exemple *Plant Physiol.* et *J. Exp. Bot.*). Ces indications, ainsi que l'ensemble des productions écrites de M. Fabienne Micheli, qui compte la parution d'articles dans plusieurs revues d'IF>2, atteste de la qualité scientifique des travaux auxquels elle a participé ou directement encadré.

Depuis son expatriation au Brésil, M. Micheli participe très activement aux charges d'enseignement de l'UESC, aussi bien dans les cours de 2^{ème} et de 3^{ème} cycle. Ces activités, initiées dès 2003 (soit 1 an après son arrivée en expatriation), se concrétisent par une charge d'enseignement de 60h théorique en 3^{ème} cycle pour l'année 2008. Par ailleurs, M. Micheli assume la fonction de vice-coordinatrice de l'Ecole doctorale de l'UESC et a été récemment nommée comme membre du comité d'évaluation de la FAPESB. Au sein de l'UESC, M. Fabienne Micheli a été plusieurs fois membre de jurys de qualification de doctorat et de master (mestrado) et a participé à plusieurs jurys de sélection d'étudiants pour l'entrée en 3^{ème} cycle.

Au niveau des activités de recherche, M. Micheli assure personnellement la coordination de plusieurs projets financés par différents bailleurs de fonds brésiliens (CNPq et FAPESB) mais aussi internationaux (IFS). L'obtention de ces projets a permis l'octroi de bourses d'études dont ont bénéficié plusieurs étudiants en formation à l'UESC à différents niveaux (master et doctorat). De fait, M. Micheli a participé (et participe encore) à l'encadrement de nombreux étudiants, 11 étudiants (en 5 ans) sous sa propre orientation et 7 en co-orientation. Il est également à noter que M. Micheli est impliquée dans le développement de plusieurs réseaux de collaboration scientifique principalement en intra-Brésil. Dans leur ensemble, ces informations, qui apparaissent clairement dans la première partie du manuscrit, montrent les qualités de M. Micheli tant au niveau pédagogique, scientifique que des relations humaines.

La synthèse des travaux de recherche présentée par M. Micheli est essentiellement focalisée sur l'étude de l'interaction *M. perniciosus* – *T. cacao*. Celle-ci commence par une description du cacaoyer et sur l'historique et l'importance de cette filière au Brésil. Une présentation de la maladie du balai de sorcière est présentée et les impacts économiques, sociaux et environnementaux (effets sur le biotope local *Mata atlantica*) sont discutés. Le cycle de développement du pathogène, les moyens de lutte utilisés contre celui-ci, les possibilités d'utilisation de clones de *T. cacao* tolérants et sensibles à *M. perniciosus* et les méthodes de culture de *M. perniciosus* sur milieux artificiels sont également présentés. Les recherches conduites par M. Micheli ont permis d'optimiser les conditions de culture *in vitro* de ce pathogène, préalable essentiel pour mieux connaître les facteurs trophiques et génétiques qui contrôlent les changements de phase du développement de ce pathogène. Dans cette partie, on peut regretter la faible qualité des figures utilisées en appui au manuscrit.

Les analyses de biochimie et de protéomique de *M. perniciosus* ont permis de montrer que l'activité chitinase de ce pathogène est régulée (*in vitro*) par les teneurs en carbone et en azote du milieu de culture. Ces chitinases, qui sont codées par au moins deux gènes (*MpChit1* et *MpChit2*), pourraient être la cible de méthodes de lutte contre l'infection de *T. cacao* par *M. perniciosus*. Les travaux se sont aussi focalisés sur l'étude des gènes (*MpNEP1* et *MpNEP2*) de *M. perniciosus* qui semblent être impliqués dans le processus de nécrose des tissus de cacaoyer. Les résultats de ses recherches ont fait l'objet de 6 publications. Des travaux sont actuellement en cours (thèse et master sous l'orientation de M. Micheli) pour poursuivre l'étude de ces gènes de *M. perniciosus* mais aussi des gènes codant pour des enzymes de type pectinase.

M. Micheli développe ensuite les stratégies de recherche mises en œuvre pour mener les analyses moléculaires et fonctionnelles de *M. perniciosus* et de l'interaction de ce pathogène avec *T. cacao*. Celles-ci sont essentiellement basées sur la construction de banques d'ADNc de méristèmes des clones TSH1188 (résistant) et Catongo (sensible) de *T. cacao*. Par ailleurs, des banques soustractives de type « SSH » de différents clones de *T. cacao* (\pm infection par *M. perniciosus*) sont aussi en cours de construction. A ce stade du manuscrit, on peut regretter un manque de clarté sur la situation de la recherche concernant les différents projets EST (et de génomique du cacaoyer au sens large) déjà existants ainsi que sur les thématiques de recherche suivies par ces différentes équipes (nationales ou internationales). Cet état des lieux aurait en effet permis de mieux situer l'importance des travaux développés par M. Micheli dans un contexte international.

Le traitement *in silico* de ces banques est détaillé succinctement et a fait l'objet d'une publication dans *Ann. Bot.* Des analyses utilisant des membranes de type « microarray » ont ensuite permis d'identifier plusieurs groupes (clusters) de gènes qui présentent des profils différentiels d'expression avec le temps d'infection par *M. perniciosus* (article soumis pour publication). Les gènes candidats *G-OXO* et *TcPR10* de *T. cacao*, codant respectivement pour une oxalate oxydase et une ribonucléase, ont fait l'objet de travaux plus approfondis (2 publications). M. Micheli détaille le cas du gène *TcPR10*, surexprimé dans le clone sensible (Catongo) et pour lequel la protéine a été surexprimée chez *Escherichia coli*. *In vitro*, cette protéine présente une activité RNase à la fois contre les ARN totaux extraits de *T. cacao* et de *M. perniciosus* ce qui suggère la participation du gène *TcPR10* dans le processus de mort cellulaire programmée (PCD) des cellules végétales infectées par le pathogène. Plusieurs autres gènes candidats de *T. cacao* pour la tolérance/sensibilité à *M. perniciosus* sont actuellement en cours d'analyse notamment par la technique de qPCR. La validation fonctionnelle de ces gènes est également envisagée par des tests de transformation hétérologues chez *Solanum lycopersicum* (tomate). Enfin, M. Micheli présente les interactions possibles entre ces travaux et ceux portant sur la construction et l'exploitation des cartes génétiques de *T. cacao* déjà disponibles ou en cours d'élaboration (Ceplac), par exemple pour vérifier si les gènes candidats étudiés co-localisent avec des QTL pour la maladie du balai de sorcière. La proximité physique de l'UESC et de la Ceplac constitue certainement un contexte scientifique particulièrement favorable à l'avancé et au succès de cette stratégie.

Le projet de recherche présenté par M. Micheli est une continuation des travaux en cours de réalisation à l'Université Estadual de Santa Cruz (UESC) et s'inscrit dans le cadre du renouvellement (jusqu'en 2012) du partenariat scientifique du Cirad avec cette université. Ce projet porte toujours sur le thème de l'étude des interactions de *M. perniciosus* avec *T. cacao*. Il constitue donc une suite logique aux travaux développés par M. Micheli pendant 6 ans et prévoit notamment (i) des études fonctionnelles des gènes candidats (GC) pré-identifiés, (ii) le développement d'approches de transcriptomique par les techniques « microarray » (pour valider ses GC ou rechercher d'autres GC), (iii) l'ancrage de ces GC sur les cartes génétiques de *T. cacao*, (iv) des études d'expression des GC au sein de différents géotypes pour la recherche de QTL d'expression (eQTL) et (v) le développement d'approche de protéomique ou de métabolomique (MS/MS) pour la recherche de critères permettant, par exemple, de différencier les phénotypes des clones *T. cacao* vis-à-vis de *M. perniciosus*. A plus long terme, les possibilités d'application des résultats de ce projet à d'autres pathosystèmes du cacao sont également envisagées.

Bien que peu originales, les différentes approches proposées dans ce projet sont importantes pour approfondir les connaissances des mécanismes d'interaction *M. perniciosus* avec *T. cacao*. Même si ce projet est tout à fait pertinent d'un point de vue scientifique, sa présentation est cependant un peu superficielle. Quoi qu'il en soit, il s'appuie sur les excellents partenariats déjà développés localement par M. Micheli. Compte tenu de la forte implication de M. Micheli au sein de l'UESC et des soutiens financiers disponibles en particulier en intra-Brésil, ce projet bénéficie aussi d'une situation privilégiée qui laisse entrevoir de réelles chances de succès dans l'obtention de résultats très intéressants tant d'un point de vue fondamental qu'appliqué. A juste titre, la nécessité d'intégrer ce projet à d'autres actions nationales ou internationales (projets ANR, dispositif CIBA) est mise en avant par M. Micheli.

En conclusion, ce mémoire montre les qualités de M. Micheli dans l'élaboration, la conduite et la gestion de projets de recherches. Il souligne aussi très clairement sa capacité à enseigner, à encadrer et à former de jeunes scientifiques. Les articles publiés par M. Micheli attestent également de la qualité de ses travaux et de ses aptitudes à animer un groupe de recherche. Compte tenu de ces éléments, je donne un avis très favorable à l'Université de Paris-XI pour la soutenance de cette Habilitation à Diriger des Recherches.

Rapport

Habilitation à diriger des recherches de Fabienne Micheli

Université de Paris Sud XI

Fabienne Micheli a effectué ses recherches dans le domaine végétal. Ses travaux sont présentés dans un mémoire très agréable à lire décrivant son parcours. Trois périodes se sont succédées : (1) un doctorat à l'Université Paris VI (1997-2001) sous la direction de Renée Goldberg, intitulé « Etude moléculaire et biochimique des pectines méthylestérases dans la différenciation cambiale chez le peuplier ; (2) un post-doctorat (2001-2002) dans l'équipe de Pascal Gamas dans le Laboratoire de Biologie Moléculaire des Relations Plantes-Microorganismes à l'INRA de Toulouse portant sur le l'étude du programme symbiotique précoce de *Medicago truncatula* par génomique fonctionnelle ; (3) son recrutement au CIRAD à Montpellier en 2002 dans l'équipe Génomique et Sélection de l'UMR DAP (Développement et Amélioration des Plantes) et son affectation rapide, la même année, à l'Université d'Etat de Santa Cruz (UESC) au Brésil.

Fabienne Micheli a été amenée à travailler sur différentes thématiques : la différenciation des cellules cambiales chez le peuplier, le mécanisme de nodulation dans la symbiose *Rhizobium* Légumineuse et les phénomènes d'infection d'un champignon et de résistance de la plante dans l'interaction *Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa*. Ceci montre une large connaissance du fonctionnement des végétaux tant au point de vue de leur développement que de leurs interactions avec des micro-organismes. Par ailleurs, la réalisation des deux derniers projets portant sur les interactions plantes-microorganismes a requis la mise en œuvre d'approches génomiques.

Chacune de ces thématiques a fait l'objet de publications dans des revues internationales (14) à comité de lecture ayant des facteurs d'impact s'échelonnant entre 1,861 à 8,995 : pectine méthylestérase (4), nodulation (2), interaction *Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa* (8). Fabienne Micheli est premier auteur pour trois d'entre elles traitant de son sujet de thèse, tandis qu'elle est dernier auteur pour trois autres publications traitant de son travail actuel au Brésil. Fabienne Micheli est également co-auteur de 28 communications dans des congrès internationaux dont 11 orales, et de 54 communications dans des congrès nationaux dont 10 orales. Enfin, elle est premier auteur de trois chapitres de livres.

Fabienne Micheli est coordinateur de quatre projets de recherches brésiliens et a également obtenu des bourses d'études pour ses étudiants. A son arrivée à l'UESC, Fabienne Micheli s'est intégré dans un groupe de recherche récemment créé, constitué de jeunes chercheurs et, apparemment, très dynamique, ce qui l'a amené à prendre rapidement des responsabilités importantes tant au niveau du financement et de la gestion de la recherche qu'au niveau de la formation des étudiants à la recherche.

Ainsi, Fabienne Micheli a déjà assuré l'encadrement de 12 étudiants de 2^{ème} cycle et également de 3^{ème} cycle (5 Masters). De plus, elle est actuellement l'encadrant principal de quatre Doctorants et d'un étudiant en Master ! En addition à une activité d'enseignement non négligeable (plus de 100 heures de cours donné en 2008), Fabienne Micheli est directement impliquée en tant que vice-coordinatrice dans la gestion et l'administration de l'école doctorale « Génétique et Biologie Moléculaire » de l'UESC. L'ensemble de ces activités démontre la capacité de Fabienne Micheli à animer des travaux de recherche et à sa volonté de partager ses connaissances dans des activités d'enseignement.

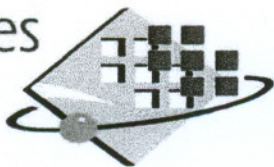
Dans son mémoire d'HDR, Fabienne Micheli a délibérément choisi de ne présenter que son travail depuis son recrutement au CIRAD et son affectation à l'UESC au Brésil, sur l'interaction *T. cacao-M. perniciosa*. Depuis 2002, Fabienne Micheli a contribué à, puis à développer des projets de recherche portant sur ce thème. Tout d'abord, un projet sur la mise au point de la culture de *M. perniciosa* en milieu artificiel, puis des études moléculaires et fonctionnelles de l'interaction *T. cacao-M. perniciosa*, mettant en œuvre des approches de génomique au niveau du transcriptome et du protéome et également des approches plus ciblées sur des mécanismes clés de l'interaction, tels que l'implication de différentes enzymes (chitinases, protéases et pectinases).

Dans son projet, en continuation directe avec ses recherches menées depuis 2002, Fabienne Micheli souhaite approfondir l'étude de l'interaction *T. cacao-M. pernicioso*. Dans ce projet, plusieurs axes de recherche sont envisagés : étude fonctionnelle de gènes candidats choisis à partir du savoir déjà acquis ou développement d'approches expressionnelles au niveau du transcriptome ou du protéome. Les stratégies envisagées sont rationnelles et devraient conduire à des résultats productifs en termes de publications. Quelle que soit l'orientation choisie, ces études devront être menées en étroites concertations avec les études génétiques ayant pour but d'obtenir une résistance durable de *T. cacao* vis-à-vis de *M. pernicioso* et ainsi avoir les retombées appliquées espérées.

Ainsi, Fabienne Micheli a développé des recherches originales dans différentes thématiques chaque fois validées par des publications. De plus, elle assure depuis plusieurs années l'encadrement d'étudiants en master et en doctorat. Sa capacité à maîtriser des stratégies de recherche est illustrée par la diversité des approches expérimentales qu'elle a su mettre en œuvre pour répondre aux questions biologiques posées. Je suis donc très favorable à la soutenance de son Habilitation à Diriger des Recherches à l'Université de Paris Sud XI.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'G' and 'P' followed by a horizontal line.

Gilles Pilate
Directeur de recherche INRA
Orléans, le 20 mars 2009



HABILITATION A DIRIGER LES RECHERCHES

(arrêté du 25 Avril 2002)

N° d'ordre :

1206

RAPPORT DE SOUTENANCE

établi par le Président du Jury

Don Michel

BIOLOGIE

de :

Madame MICHELI Fabienne


Date de soutenance :


21 avril 2009

Mme Fabienne Micheli a fait
une remarquable soutenance
HDR, lors de laquelle elle
a démontré une maîtrise
de toutes les qualités
attendues pour cet examen :
- recul scientifique
- maîtrise du sujet
- réflexion sur la direction de
recherche
- Prospective sur la technologie
à développer.

21/04/09
Date et Signature des membres du jury

 M. DON

 G. PILATE

 S. Manaccini

 JP Renou

 J. SHYKOFF